



# Dysfonctions neurovasculaires et mitochondriales dans un modèle néonatal d'ischémie cérébrale focale

Pierre-Louis Leger

## ► To cite this version:

Pierre-Louis Leger. Dysfonctions neurovasculaires et mitochondriales dans un modèle néonatal d'ischémie cérébrale focale. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66561 . tel-00833157

**HAL Id: tel-00833157**

**<https://theses.hal.science/tel-00833157>**

Submitted on 12 Jun 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**  
**Ecole doctorale Cerveau-Cognition-Comportement**

Spécialité: NEUROSCIENCES

Thèse pour obtenir le grade de  
Docteur ès Sciences de l'Université Pierre et Marie Curie  
PARIS VI-UPMC

**Dysfonctions neurovasculaires et mitochondriales  
dans un modèle néonatal d'ischémie cérébrale focale**

**Présentée et soutenue publiquement**

Le 12 octobre 2012

**Pierre-Louis LEGER**

**Pr Michel Plotkine**

**Président du jury**

**Pr Nathalie Kubis**

**Rapporteur**

**Dr Bruno Gonzalez**

**Rapporteur**

**Dr Michèle Bastide**

**Examineur**

**Dr Bruno Cauli**

**Examineur**

**Dr Christiane Charriaut-Marlangue**

**Directeur de thèse**

## Préambule

Si les accidents vasculaires cérébraux du nouveau-né sont moins fréquents que ceux de l'adulte (même si on les sous-estime fortement) il n'en reste pas moins que les situations ischémiques sont fréquentes dans notre pratique de réanimateur-pédiatre. Elles peuvent être d'origine systémique (arrêt cardiorespiratoire, asphyxie périnatale) ou focale (thromboembolique compliquant une assistance circulatoire ou troubles de l'hémostase). Mais ce qui demeure actuellement c'est le faible arsenal thérapeutique dont nous disposons...en résumé aucun! ...excepté peut être une légère hypothermie dans certains cas bien précis!

En 40 ans, les travaux menés dans le domaine de l'ischémie cérébrale adulte ont été nombreux, tant sur le plan de la recherche expérimental que clinique. L'apparition de la thrombolyse a révolutionné le pronostic des AVC ischémique de l'adulte. D'autres thérapeutiques apparaissent et semblent très prometteuses (ciclosporine A, postconditionnement ischémique et médicamenteux)

Et le nouveau-né dans tout ça? Lui, il reste avec ses problèmes de nouveau-né! Aucun traitement neuroprotecteur dans l'AVC ischémique. Depuis 30 ans beaucoup de molécules ont été expérimentées en préclinique avec beaucoup d'espoir. Et puis peu de molécules testées en clinique et beaucoup de désespoir. De mon point de vue un cuisant échec de notre système moderne, peut être encore trop tournée vers ses riches vieillards... et les conditions d'exercice de nos chercheurs deviennent difficiles, humainement déficitaires, financièrement anorexiques.

Nous ne devons plus aujourd'hui négliger la recherche fondamentale et clinique chez l'enfant sous prétexte que les débouchées pharmaceutiques sont réduites. Et puis de toutes les façons « le bébé est un petit adulte ! » comme ils disent! Et bien non, c'est faux ! Que de très nombreux travaux scientifiques se sont efforcés de prouver et tout particulièrement dans le domaine de l'hypoxie-ischémie et le neurodéveloppement.

Il est probablement temps maintenant de concevoir la recherche chez l'enfant comme le point de départ de la recherche pour l'adulte, et non l'inverse. Il faut continuer à la promouvoir et à la financer. Restons vaillants, soyons confiants quant aux solutions thérapeutiques pour nos enfants dont nous disposerons à l'avenir.

« Aujourd'hui peut-être ou alors demain... »

# Remerciements

Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont participé, de près et de loin à ce projet de thèse, et ont fait en sorte qu'il aboutisse.

**à la Fondation pour le Recherche Médicale**, pour le financement de ma dernière année de thèse

**à Jean Mariani** pour m'avoir aidé à réaliser mon master dans l'UMR 7102 à Jussieu puis de m'avoir permis de débiter ma thèse dans l'unité

**à Olivier Baud et à Pierre Gressens**, pour avoir permis de poursuivre et de terminer cette thèse dans l'unité U676 à Robert Debré, en m'apportant toute l'aide et la logistique disponibles.

**à toute l'équipe de l'unité U676**, et particulièrement à **Julien Pansiot, Jérémy Dalous et Hoa Pham Thi** pour leur aide et leur amitié

**à Sébastien Fau**, pour ces années passées entre l'hôpital et le labo, et ces discussions que nous avons eu, et ce tu m'as appris.

Aux ceux qui ont été des acteurs plus que dynamiques dans ce projet,

**à Thao Nguyen, Claire Ibanez, Cindy Riou** pour les expériences qu'elles ont menées pour permettre l'avancement des travaux

**à Michel Plotkine** pour avoir accepté d'être le président du jury

**à Nathalie Kubis et Bruno Gonzalez** pour avoir accepté d'être rapporteurs

**à Bruno Cauli et Michèle Bastide** pour avoir accepté d'être membres du jury

A ceux qui ont été les piliers dans la conception ou la réalisation de ces travaux

**à Abdallah Gharib, Elisabeth Couture-Lepetit, Damien De Paulis et à toute l'équipe de l'unité INSERM U1060** à Lyon, pour les explorations mitochondriales qu'ils ont réalisées mais aussi pour leur formidable accueil à chacune de nos rencontres

**à Pierre Lacombe**, pour son travail concernant les expériences d'autoradiographie, et sa connaissance précieuse de la circulation cérébrale qui nous largement bénéficiée à la compréhension des mécanismes

**à Philippe Bonnin**, pour son implication fondamentale dans les expérimentations animales en Doppler ultrasons, pour ses compétences de physiologiste éclairé, sans lequel ces travaux n'auraient pu voir le jour...

...et pour le reste, tout a déjà été dit entre nous!

A ceux à qui je dois tout

à **Sylvain Renolleau**, celui qui m'a presque tout appris en réanimation, celui qui m'a fait confiance dès le début, celui qui un jour m'a dit « tu veux faire un master ? »... toute la suite découle de ce moment là. Mon parcours a été jalonné de rencontres exceptionnelles! Celle là en est une. On dit que la vie est faite, de rencontres, de hasards, d'opportunités. Si tout cela a été possible, je crois que c'est grâce à lui.

à **Christiane**, « notre muse à tous ! » Mille mercis ne suffiraient pas pour lui exprimer toute ma gratitude. Les emplois du temps ont parfois été compliqués à synchroniser, entrecoupées de trop longues « périodes de clinique », et pas assez de temps consacré à la recherche. Mais elle a toujours été conciliante. Depuis notre relation est devenue bien plus qu'une simple relation professionnelle. J'espère que je saurai faire fructifier tout ce qu'elle m'a enseigné au cours de ces années.

A ceux qui m'ont toujours soutenu dans les moments de doute

à **ma famille, à mes amis**

à **mes parents**, pour toute l'affection qu'ils m'ont apportée

à **Nicole, André, Brigitte et Jean Marc**, pour leurs soutiens indéfectibles

à **mes frères**, toujours là quand il faut !

Enfin, à **Laurence ma merveilleuse femme**, qui durant toutes ces années a fait tant de concessions et de sacrifices dans notre vie familiale et dans sa vie professionnelle pour que je puisse réaliser tous ces projets....aujourd'hui cette réussite et ces résultats sont, bien sûr, aussi les siens !

à **Lucie ma petite chérie**.

## Résumé en français

Nos travaux de recherche menés dans l'ischémie cérébrale néonatale ont évalué l'effet de la Ciclosporine A sur la réduction du volume lésionnel, mais aussi sur le fonctionnement du métabolisme mitochondrial. Nous avons également étudié l'effet du postconditionnement ischémique et les conséquences hémodynamiques de la reperfusion.

Le pore de perméabilité membranaire mPTP s'ouvre au cours de l'ischémie néonatale. La CsA, inhibiteur de la Cyclophiline D freine l'ouverture du pore mPTP, améliore la capacité de recapture du calcium par la mitochondrie, la respiration mitochondriale, et limite les effets inflammatoires de l'ischémie. Néanmoins, la CsA ne réduit pas le volume des lésions cérébrales. Nous avons pu montrer que la Cyclophiline D et le pore mPTP étaient bien deux acteurs majeurs dans la constitution des lésions induites par la reperfusion dans l'ischémie cérébrale focale néonatale.

Le postconditionnement ischémique ne permet pas de réduire les volumes des lésions. Nous avons montré que la reperfusion chez le jeune était progressive et lente, sans hyperhémie comme chez l'adulte. Cette cinétique de reperfusion est identique dans les deux hémisphères, tant pour la perfusion tissulaire corticale que pour la perfusion des régions cérébrales profondes. La vasoconstriction cérébrale chez le jeune traduit le recrutement précoce de la circulation collatérale mais aussi les dysfonctionnements de la microcirculation cérébrale.

Au final, ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques spécifiques au profil particulier de la reperfusion dans le cerveau immature.

**Mots-Clés :** ischémie cérébrale focale néonatale- lésions de la reperfusion- Ciclosporine A- pore mitochondrial mPTP- Postconditionnement ischémique- respiration mitochondriale- reperfusion précoce- circulation collatérale – microcirculation cérébrale – reperfusion régionale

## Résumé en anglais

### Neurovascular and mitochondrial dysfunctions in a neonatal rat stroke model

We evaluated Ciclosporine A effect on brain lesions, and afterwards we explored the mitochondrial metabolism. We have studied the ischemic postconditioning neuroprotective effects and the hemodynamic consequences of the reperfusion.

We have shown the mitochondrial permeability transition pore was opened during neonatal ischemia. Ciclosporine A increased calcium reuptake into mitochondria, but also improved the mitochondrial respiration. Ciclosporine A limited the inflammatory processes during ischemia. However, CsA did not reduce the volume of brain lesions. In conclusion, we have shown that Cyclophilin D and the mPTP pore were two major elements in neonatal cerebral ischemia.

We have also explored the ischemic postconditioning neuroprotective effects. We did not show a decrease in brain lesions. Nevertheless, we have demonstrated that reperfusion was different in neonatal and adult models, because of a gradual and slow reperfusion in the early reperfusion phase, instead of hyperemia. We have highlighted that the reperfusion had the same kinetic profile in both hemispheres, concerning superficial cortical perfusion and deep cerebral perfusion.

We concluded that cerebral vasoconstriction was the sign of the cerebral microcirculation dysfunction. The microcirculation was altered in neonatal cerebral ischemia but differently than in adult models. The early collateral recruitment could explain these differences.

#### **Key Words**

Neonatal focal cerebral ischemia- reperfusion injury- Ciclosporine A- mitochondrial mPTP pore - ischemic postconditioning- mitochondrial respiration- early reperfusion- collateral circulation - cerebral microcirculation- regional reperfusion

## Laboratoires de recherches

### **Unité de recherche CNRS-UNR7102**

Université UPMC- Paris VI Site Jussieu

Directeur de Laboratoire Pr Jean Mariani

Chef d'équipe Dr Christiane Charriaud-Marlangue

9 quai Saint Bernard

Bâtiment B, 3e étage

75005 PARIS

### **Unité de recherche INSERM-U676**

Université Denis Diderot- Paris VII Site Robert Debré

Directeur de laboratoire Dr Pierre Gressens

Directeur d'unité Pr Olivier Baud

Hôpital Robert Debré

48, boulevard Sérurier

75935 Paris cedex 19

Tel 01 40 03 19 82



# Table des Matières

1 --	Introduction .....	15
1.1 --	Ischémie cérébrale focale du nouveau-né .....	15
1.1.1 --	Epidémiologie .....	15
1.1.2 --	Physiopathologie.....	15
1.1.2.1 --	Principaux modèles néonataux d'ischémie cérébrale focale chez le rat .....	16
1.1.2.2 --	Modèle d'ischémie focale par occlusion endovasculaire de l'ACM.....	16
1.1.2.3 --	Modèle d'hypoxie-ischémie .....	17
1.1.2.4 --	Modèle d'ischémie focale transitoire par électrocoagulation de l'ACM.....	17
1.2 --	La circulation cérébrale .....	21
1.2.1 --	Description de la circulation cérébrale.....	21
1.2.1.1 --	Système artériel .....	21
1.2.1.2 --	Système veineux.....	22
1.2.1.3 --	Réseau anastomotique artériel.....	22
1.2.2 --	Régulation de la perfusion cérébrale.....	29
1.2.2.1 --	Principes hémodynamiques .....	29
1.2.2.2 --	Unité Neurovasculaire .....	30
1.2.2.2.1	Une organisation en réseau .....	31
1.2.2.2.2	Astrocyte .....	32
1.2.2.2.3	Cellule endothéliale vasculaire .....	33
1.2.2.2.4	Péricytes .....	34
1.2.2.2.5	Innervation périvasculaire .....	34
1.2.2.2.6	Cellule musculaire lisse vasculaire .....	35
1.2.2.3 --	Modèle de vasodilatation rétrograde .....	36
1.2.2.4 --	Autorégulation cérébrale .....	37
1.2.2.5 --	Vasoréactivité cérébrale au CO <sub>2</sub> .....	39
1.2.3 --	L'ischémie cérébrale .....	47
1.2.3.1 --	Dysfonctions macrocirculatoires.....	47
1.2.3.2 --	Dysfonctions microcirculatoires .....	49
1.2.3.2.1	Barrière hémato-encéphalique .....	49
1.2.3.2.2	Endothélium vasculaire .....	50
1.2.3.2.3	Membrane basale .....	51
1.2.3.2.4	Reperfusion de la microcirculation .....	51
1.2.4 --	La reperfusion .....	53
1.2.4.1 --	Lésions induites par la reperfusion .....	53
1.2.4.2 --	Stress oxydatif.....	54
1.2.4.3 --	Influence du pH intracellulaire .....	56

1.2.5 --	La mitochondrie au cours de l'ischémie cérébrale .....	60
1.2.5.1 --	Le Pore de perméabilité membranaire mitochondrial .....	60
1.2.5.1.1	Ancien et Nouveau paradigmes .....	60
1.2.5.1.2	Constitution du pore mPTP .....	61
1.2.5.1.3	Ischémie cérébrale adulte .....	63
1.2.5.1.4	Ischémie cérébrale du cerveau immature.....	65
1.2.5.1.4.1	Modèles d'ischémie anténatale .....	65
1.2.5.1.4.2	Modèles d'ischémie postnatale .....	66
1.2.5.2 --	Le métabolisme oxydatif.....	68
1.2.5.2.1	Explorations de la respiration mitochondriale .....	68
1.2.5.2.2	Ischémie cérébrale du cerveau adulte.....	70
1.2.5.2.3	Ischémie cérébrale du cerveau immature.....	73
2 --	Objectifs des travaux de recherches au cours du doctorat .....	80
3 --	Matériels et méthodes .....	81
3.1 --	Procédures chirurgicales expérimentales .....	81
3.1.1 --	Modèle néonatal d'ischémie-reperfusion .....	81
3.1.2 --	Protocole de mesure du volume de l'infarctus .....	81
3.1.3 --	Protocole de traitement par la Ciclosporine A .....	81
3.1.4 --	Protocole de Postconditionnement ischémique .....	82
3.1.5 --	Monitoring des paramètres physiologiques sanguins .....	82
3.2 --	Explorations mitochondriales.....	82
3.2.1 --	Préparation des mitochondries isolées.....	82
3.2.2 --	La microscopie électronique.....	83
3.2.3 --	Mesure de la capacité de rétention du $Ca^{2+}$ mitochondrial .....	83
3.2.4 --	La consommation d'oxygène mitochondriale.....	84
3.3 --	Analyse histochimique par Western blot .....	84
3.4 --	Explorations radio-isotopiques .....	84
3.4.1 --	La mesure quantitative multifocale du DSC.....	84
3.5 --	Explorations des débits et flux sanguins cérébraux.....	85
3.5.1 --	Le Doppler ultrasons .....	85
3.5.2 --	Laser Doppler et Laser imageur tissulaire .....	87
4 --	Résumés et articles de la thèse .....	89
4.1 --	Article 1 : Evaluation de la Ciclosporine A dans un modèle d'ischémie cérébrale focale transitoire chez le raton P7.....	89
	Article 2 : Le postconditionnement ischémique dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire néonatale .....	93

Article 3: Imagerie dynamique de la reperfusion précoce dans un modèle d'ischémie cérébrale néonatal .....	97
5 -- Discussion.....	101
5.1 -- Discussion à propos de l'article 1 .....	101
5.2 -- Discussion à propos de l'article 2 .....	105
5.3 -- Discussion à propos de l'article 3 .....	110
5.4 -- Conclusion Générale.....	115
6 -- Références bibliographiques.....	116

Tables des illustrations

Figure 1 ..... 19

Figure 2 ..... 24

Figure 3 ..... 26

Figure 4 ..... 27

Figure 5 ..... 28

Figure 6 ..... 42

Figure 7 ..... 44

Figure 8 ..... 46

Figure 9 ..... 58

Figure 10 ..... 59

Figure 11 ..... 75

Figure 12 ..... 76

Figure 13 ..... 77

Figure 14 ..... 78

## Liste des abréviations

ACM	Artère cérébrale moyenne
ACA	Artère cérébrale antérieure
ACP	Artère cérébrale postérieure
AMPc	Adénosine mono-phosphate cyclique
ANT	Adénine nucléotide transférase
ARC	Autorégulation cérébrale
ATP	Adénosine tri-phosphate
AVC i	Accident vasculaire cérébral ischémique
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BK	Canal potassique membranaire
CNV	Couplage neurovasculaire
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CoX	Cyclooxygénase
CoX	Cyclooxygénase
CRC	Calcium recapture
CsA	Ciclosporine A
CyP-D	Cyclophiline D
Cyp-P-A	Cyclophiline A
Doppler US	Doppler ultrasons
DSC	Débit sanguin cérébral
DSCr	Débit sanguin cérébral régional
eNOS	NOS endothéliale
eNOS	NOS inductible
ET	Endothéline
FST	Flux sanguin cérébral
GMPc	Guanosine mono-phosphate cyclique
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
H-I	Hypoxie-ischémie
HNO	Nitrosyl
L/R	gauche puis droite
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LDP	Laser doppler de perfusion
MCT	Monocarboxylate transport
MEC	Matrice extracellulaire
mPTP	mitochondrial permeability transition pore
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trioxyde d'azote

NBC	Canal $\text{HCO}_3^-/\text{Na}^+$
NCE	Echangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NHE	Echangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$
nNOS	NOS neuronale
$\text{NO}_2^-$	Dioxyde nitrogéné
NOS	Nitric oxyde synthase
NOX	ADPH oxydase
ns	statistiquement non significatif
$\text{O}_2$	Oxygène
$\text{O}_2^-$	Anion superoxyde
$\text{OH}^-$	radical hydroxyl
$\text{ONOO}^-$	Péroxynitrite
PCi	Postconditionnement ischémique
$\text{PGE}_2$	Prostaglandine E2
$\text{PGI}_2$	Prostaglandine I2
pHi	pH intracellulaire
PIC	Phosphate inorganic carrier
PKB	Phosphokinase B
pmf	proton motrice force
PTM	Pression transmurale
R/L	droite puis gauche
RCR	Respiratory control ratio
RE	Réticulum endoplasmique
RI	Reperfusion injuries
RISK	Reperfusion injury salvage kinases
RNS	Radicaux libres nitrosylés
ROS	Radicaux libres oxygénés
RVC	Résistances vasculaires cérébrales
RVS	Résistances vasculaires systémiques
SAFE	Survivor Activating Factor Enhancement
Se	Sensibilité
SOD	Superoxyde dismutase
Spe	Spécificité
TB	Tronc basilaire
UNV	Unité neurovasculaire
Vd	Vélocité diastolique
VDAC	Canal mitochondrial voltage dépendant
VDCC	Canal calcique voltage dépendant

Vm	Vélocité moyenne
VRCO2	Vasoréactivité au CO2
Vs	Vélocité systolique

# 1 -- Introduction

## 1.1 -- Ischémie cérébrale focale du nouveau-né

### 1.1.1 -- Epidémiologie

Les accidents vasculaires cérébraux ischémiques (AVCi) d'origine artérielle peuvent survenir chez le nouveau-né. Les enjeux sont importants en termes de diagnostic, de dépistage, et de traitement. En effet, les AVCi néonataux sont un réel problème de santé publique, par ailleurs méconnu. Leur incidence exacte est difficile à déterminer avec précision. Les études rapportent un taux pouvant varier de 1:4000 à 5000 naissances<sup>1, 2</sup> à 1:2500<sup>3</sup>. Dans les séries autopsiques, on rapporte une fréquence de l'ordre de 17%.<sup>4</sup> L'incidence est proche de celle de l'AVCi de l'adulte estimée entre 17 et 23:100000.<sup>5</sup> L'AVCi est également la seconde cause de convulsions néonatales après l'encéphalopathie anoxo-ischémique.<sup>6</sup> Les conséquences neurodéveloppementales à long terme comprennent des déficits moteurs avec hémiparésie/hémiplégie, cognitifs, attentionnels, d'apprentissage et visuels.<sup>6-10</sup> Le pronostic de ces troubles neurologiques est difficile à évaluer dès la période néonatale. Alors que l'examen clinique est mal corrélé au devenir neurologique, l'imagerie cérébrale par IRM semble pouvoir apporter plus d'informations pertinentes sur le risque de séquelles motrices. En effet, lorsque l'atteinte du cortex s'associe à une atteinte des noyaux gris centraux et de la capsule interne ipsilatérale, les déficits moteurs surviennent dans 87% des cas.<sup>11</sup> Ces éléments montrent combien l'étendue et la topographie des lésions sont importantes pour le pronostic moteur à long terme. La prise en charge de ces enfants handicapés doit être multidisciplinaire. Le coût global pour la société est élevé. Il est donc nécessaire de promouvoir et de développer la recherche fondamentale et clinique dans le domaine des pathologies neurovasculaires aiguës de l'enfant.

### 1.1.2 -- Physiopathologie

Les mécanismes et les étiologies des AVCi néonataux sont multiples. Le processus pathologique peut débuter dès la période anténatale, en périnatale ou en postnatale. La topographie des lésions touche dans 50% dans cas le territoire de l'artère cérébrale moyenne (ACM) de manière privilégiée à gauche <sup>6</sup> responsable d'un infarctus cérébral sylvien superficiel (atteinte corticale isolée) ou profond (atteinte corticale et des noyaux gris centraux).<sup>10</sup> Les étiologies sont nombreuses: traumatismes obstétricaux, infections, asphyxie périnatale, troubles hémodynamiques, déficits congénitaux de l'hémostase, cardiopathies, malformations artérielles, embolies ou vasospasmes. Les facteurs pro-thrombotiques ont été retrouvés chez 62 AVCi



néonataux (68% des cas) dans une série de 91 patients, au premier rang desquelles l'excès en lipoprotéine A, la mutation du facteur V Leyden (résistance à la Protéine C activée), et le polymorphisme du gène MTHFR.<sup>12</sup> Une méta-analyse récente retrouve une association significative entre les AVCi de l'enfant et une thrombophilie.<sup>13</sup> Toutes ces étiologies rendent compte de la diversité et de la complexité des mécanismes mis en jeu.

#### 1.1.2.1 -- Principaux modèles néonataux d'ischémie cérébrale focale chez le rat

Les modèles utilisés pour explorer l'ischémie cérébrale à terme sont réalisés chez le raton, entre P7 et P10. Cet âge est classiquement décrit comme le plus proche, en termes de maturation cérébrale, de 34-41 semaines d'aménorrhée chez le nouveau-né humain.<sup>14, 15</sup> Il faut tout de suite préciser que l'anatomie et l'organisation fonctionnelle d'un cerveau de raton sont bien différentes de celle d'un enfant, et en premier lieu, du fait de la lissencéphalie du raton face à la gyrencéphalie de l'humain. De plus, la notion de maturation cérébrale est générique : il faudrait détailler la maturation en termes de migration neuronale, de maturation des sous-types cellulaires, de myélinisation, ou encore du rôle biologique des neurotransmetteurs.<sup>14, 16</sup> Nous ne décrivons ici que les modèles réalisés chez le rat, et nous vous renvoyons pour davantage de précisions sur les autres modèles expérimentaux vers cette excellente revue de Yager JY.<sup>16</sup>

#### 1.1.2.2 -- Modèle d'ischémie focale par occlusion endovasculaire de l'ACM

Le modèle d'ischémie focale transitoire consiste en l'occlusion de l'ACM chez le raton P7.<sup>17</sup> La méthode utilisée, inspirée d'un modèle classique chez le rat adulte, fait appel à l'introduction endoartérielle d'un fil de suture chirurgical monofilament au niveau de l'artère carotide et à son ascension jusqu'à l'émergence de l'ACM pour une durée de 3 heures. Un modèle comparable a été mis au point chez des rats juvéniles (P14-P18) dans une sous-espèce comportant une sensibilité vasculaire innée (rats spontanément hypertendus-SHR).<sup>18</sup> La lésion concerne électivement le cortex pariétal mais aussi la substance blanche sous pariétale et le striatum. Le taux de réussite semble être entre 45% et 80%.<sup>17, 19, 20</sup> L'étendue de la lésion peut être appréciée par la réalisation d'une IRM perischémique.<sup>20</sup> Il est probable que la réalisation de ce modèle avant P7 soit techniquement peu accessible. Une autre limite de ce modèle est la possibilité d'une mauvaise recanalisation vasculaire due à une lésion de l'endothélium vasculaire favorisant une thrombose. Ce modèle a été utilisé pour étudier les mécanismes de l'ischémie focale périnatale mais également pour tester plusieurs molécules de neuroprotection.<sup>21-25</sup>

### 1.1.2.3 -- Modèle d'hypoxie-ischémie

Ce modèle a été publié en 1981 par Rice et Vannucci.<sup>26</sup> Il s'agit d'une adaptation au raton P7 de la technique de Levine<sup>27</sup>, associant une ligature de la carotide commune gauche et une hypoxémie générée par l'exposition à une atmosphère appauvrie en oxygène ( $FiO_2=8\%$ ). La durée d'hypoxie initialement fixée à 210 minutes a été par la suite diminuée entre 90 et 150 minutes en fonction des équipes. Ce modèle présente classiquement une atteinte du cortex pariétal, de la substance blanche sous pariétale et du striatum. La morphologie de la lésion finale dépend beaucoup de la durée d'hypoxie et va de la perte neuronale sélective à l'infarctus cavitaires. Les atteintes du cortex prennent volontiers un aspect en colonnes, et les zones les plus lésées semblent correspondre aux zones les moins bien perfusées.<sup>28</sup> Ce modèle, techniquement très accessible, a été très largement étudié, et est à ce jour le modèle le plus utilisé dans le monde.

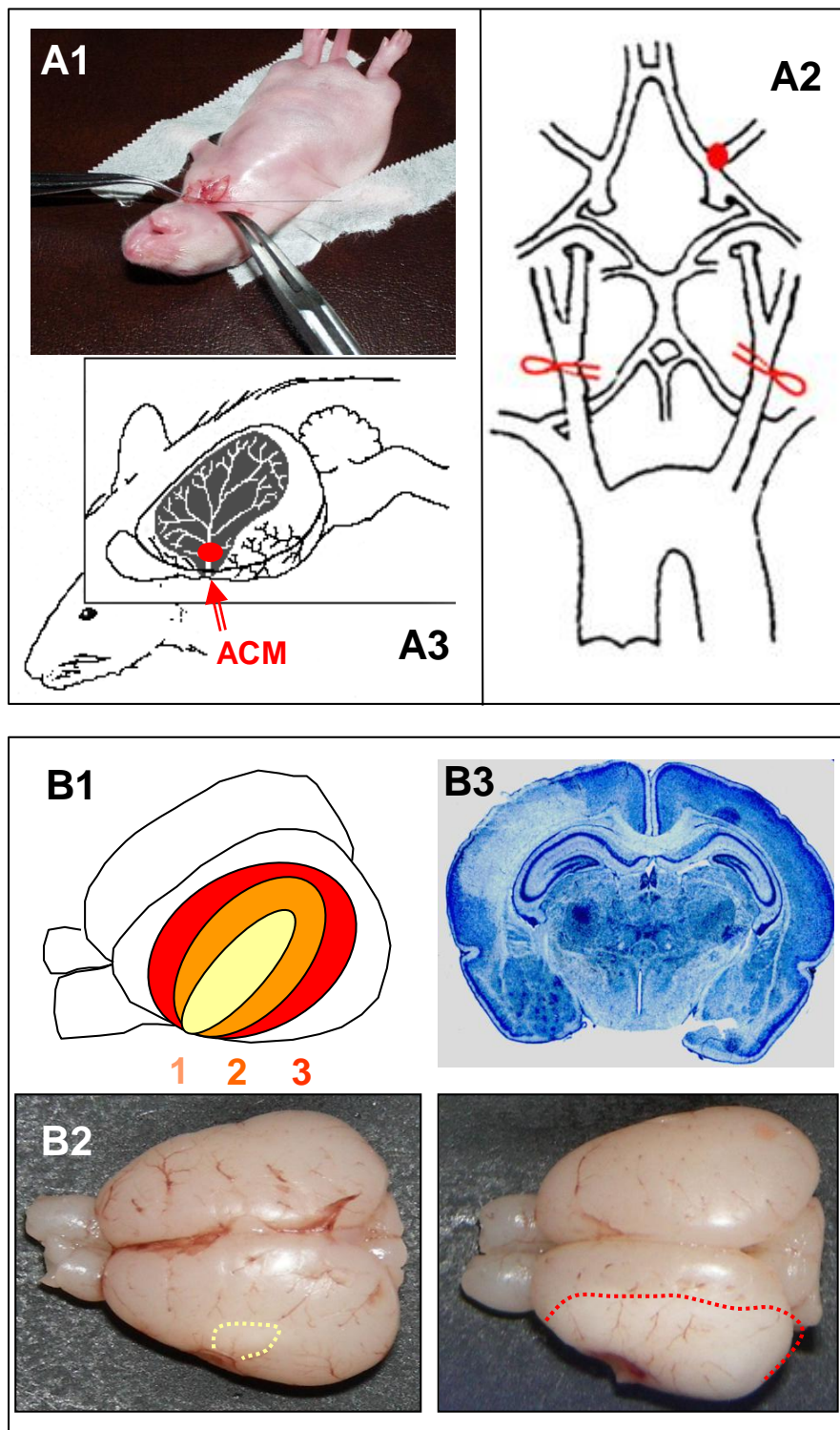
Il possède néanmoins des limites principalement liées à l'hypoxémie systémique. En effet l'hyperventilation réflexe qui en résulte génère une hypocapnie, ce qui tend à normaliser le pH malgré l'acidose lactique et à diminuer le flux sanguin cérébral par vasoconstriction réflexe.<sup>29</sup> L'hypoxémie systémique joue également un rôle sur le reste de l'organisme en particulier visible par une diminution de la pression artérielle de 25 % environ. Une autre limite de ce modèle est l'atteinte à minima de l'hémisphère controlatéral qui est d'une part soumis à l'hypoxémie transitoire systémique mise en évidence en IRM<sup>30</sup> et d'autre part soumis aux effets délétères de la ligature de la CCA ipsilatérale.<sup>31</sup> Le taux de mortalité et le taux d'échec semblent également varier d'une équipe à l'autre. Dans ce modèle d'hypoxie-ischémie (H-I) (90 minutes), 10% des animaux meurent et seulement 60% des animaux présentent une lésion.<sup>32</sup>

### 1.1.2.4 -- Modèle d'ischémie focale transitoire par électrocoagulation de l'ACM

La méthode utilisée fait appel à une électrocoagulation définitive de l'ACM et à un clampage bicarotidien pendant 50 minutes (Figure 1). Il faut noter que la seule occlusion de l'ACM ou le seul clampage des carotides sont insuffisantes pour générer une lésion d'ischémie. La lésion concerne le cortex pariétal, la substance blanche sous-corticale et dans 15 à 20% des cas le striatum. Les premières publications rapportèrent une mortalité inférieure à 10%, et l'existence d'une lésion chez 100% des animaux vivants.<sup>33, 34</sup> En fait, le modèle expérimental initial était réalisé avec le clampage de la seule carotide gauche. Avec l'apparition progressive d'une dérive du modèle se traduisant par une diminution de l'incidence des lésions cérébrales (50% en moyenne), ainsi qu'une diminution globale des volumes lésionnels, nous y avons associé le clampage de la carotide droite.<sup>35</sup> Ce modèle modifié est désormais prédominant dans nos expérimentations.<sup>35</sup>

Les limites de ce modèle sont sa technicité, l'incertitude de la recanalisation des carotides et la permanence de l'occlusion de l'ACM. Nos travaux récents ont évalué l'impact du monitoring des débits sanguins cérébraux (DSC) par Doppler ultrasons.<sup>35</sup> Les résultats montrent que les animaux sans lésion présentent une augmentation supérieure à 50% du DSC basal dans le TB pendant l'ischémie. Le corollaire est que pour les animaux présentant une lésion cérébrale, le DSC reste normal ou n'augmente pas de plus de 50% pendant l'ischémie (spe=100%, se=87%). Désormais, le Doppler ultrasons est un outil validé pour sélectionner précocement les animaux sujets à développer un infarctus. Cette sélection est désormais habituelle et rendue indispensable pour les travaux de neuroprotection.

Ce modèle a été utilisé pour étudier certains mécanismes de l'ischémie périnatale, l'apoptose<sup>33, 36-42</sup>, le rôle de la PARP<sup>34, 42</sup> et l'inflammation<sup>43-45</sup>. Les molécules de neuroprotection testées étaient majoritairement tournées vers la modulation de l'apoptose.<sup>34, 42, 46</sup> Actuellement, nos travaux s'orientent davantage sur la physiopathologie de la circulation cérébrale au cours de l'ischémie et à la reperfusion, en association avec l'évaluation de thérapies neuroprotectrices ciblant spécifiquement les lésions induites par la reperfusion (RI).



**Figure 1**

**Modèle d'ischémie cérébrale focale et évaluation du volume lésionnel** (Renolleau, Stroke 1998). **A- Le modèle d'ischémie cérébrale** focale transitoire est un modèle expérimental réalisé chez un raton Wistar à P7. La procédure chirurgicale s'effectue en 2 étapes successives. Le premier temps opératoire est le clampage transitoire pendant 50 min des carotides communes (A2) alors que l'animal est en position dorsale (A1) sous anesthésie générale par Isoflurane 1% (interface par masque nasal, non vu sur cette photo). Le second temps opératoire est suivi d'une électrocoagulation définitive de l'artère cérébrale moyenne (ACM)

gauche (A3). Au déclampage, on obtient une reperfusion des deux carotides et des territoires en aval. **B- Les lésions cérébrales** ischémiques atteignent l'hémisphère gauche (B2). Une première évaluation du volume lésionnel est effectuée après le sacrifice des animaux, par un score macroscopique (0 à 3) en fonction de l'importance de la surface cérébrale de l'hémisphère gauche atteinte (B1), visible à partir de H24 par un aspect blanc nacré du cortex. L'évaluation précise du volume lésionnel précise nécessite une quantification à partir des coupes histologiques en crésyl violet (B3). Le volume de la lésion est rapporté au volume total de l'hémisphère gauche

## 1.2 -- La circulation cérébrale

### 1.2.1 -- Description de la circulation cérébrale

#### 1.2.1.1 -- Système artériel

Le cerveau est un organe hautement vascularisé qui reçoit 20% du débit cardiaque, et un débit moyen de 100 ml/min /g de tissu cérébral. La circulation cérébrale artérielle se compose de trois artères principales interconnectées entre elles et formant le polygone de Willis.<sup>47</sup> L'artère carotide commune donne deux branches: une artère carotide externe et une artère carotide interne. Les artères carotides internes vascularisent le cerveau, les artères vertébrales en arrière forment le Tronc basilaire (TB) qui vascularise les structures de la fosse postérieure (cervelet, tronc cérébral, mésencéphale). La première branche de l'artère carotide interne est l'artère ophtalmique, puis l'artère cérébrale antérieure (ACA) en avant qui perfuse le lobe frontal. La carotide interne donne ensuite naissance à l'ACM ou artère sylvienne, qui parcourt la surface corticale au sein du sillon Rolandique. Elle vascularise le cortex fronto-pariétal. En arrière, la dernière branche de la carotide interne est l'artère communicante postérieure qui vascularise le cortex occipital et les noyaux gris centraux. Le TB donne plusieurs artères cérébelleuses (supérieures, moyennes et inférieures), puis l'artère cérébrale postérieure (ACP) qui vascularise le cortex pariéto-occipital.

Ce réseau artériel se divise ensuite en artères leptoméningées ou piales circulant à la surface corticale (Figure 2). Les artères piales possèdent un endothélium entouré d'une enveloppe musculaire lisse et d'une innervation périvasculaire. Les artères piales donnent naissance à des artéριοles de plus petit calibre qui pénètrent dans le cortex au niveau des espaces de Virchow-Robin. Les artéριοles et les capillaires forment la microcirculation cérébrale. Leur structure histologique se compose d'un endothélium entouré d'une couche de cellules musculaires lisse (artéριοles) ou d'une couche de péricytes sans cellule musculaire lisse (capillaires). L'innervation périvasculaire de la microcirculation est dite intrinsèque. Elle provient de neurones, d'interneurones et d'astrocytes du cortex, d'axones en provenance de noyaux profonds des aires sous-corticales (locus coeruleus, raphé nucleus, noyaux gris centraux). L'ensemble de ces structures neurovasculaires, formées par la triade "neurone-astrocyte-microvaisseau" compose la structure anatomico-fonctionnelle appelée unité neurovasculaire (UNV).<sup>48</sup> Cette UNV est parfois assimilée à la barrière hémato-encéphalique (BHE).

#### 1.2.1.2 -- Système veineux

Le système veineux cérébral comporte un système superficiel et profond. Il se compose de veines cérébrales et de sinus durs.<sup>49</sup> Le système veineux superficiel comprend les veines corticales qui drainent le sang veineux en provenance du cortex et de la substance blanche sous-corticale. Les veines corticales se jettent dans plusieurs sinus veineux (longitudinal supérieur, sinus latéraux, sinus d'Hérophile). En antérieur, les veines ophtalmiques et cérébrales moyennes se jettent dans le sinus caverneux et le sinus pétreux inférieur. Le système veineux profond draine la substance blanche profonde et les noyaux gris centraux (sinus longitudinal inférieur, grande veine de Galien)<sup>50</sup>, la fosse postérieure par les veines cérébelleuses et du tronc cérébral (sinus occipital, sinus pétreux). Les veines jugulaires sont les voies de sortie hors de la boîte crânienne.

Le système veineux cérébral, comme le système artériel, possède plusieurs anastomoses veineuses mettant en relation les veines superficielles et profondes, comme les veines anastomotiques supérieures et inférieures qui relient le sinus longitudinal supérieur au sinus transverse.<sup>49</sup> Il existe également des anastomoses veineuses superficielles et des anastomoses entre le système veineux intra- et extracrânien.

#### 1.2.1.3 -- Réseau anastomotique artériel

Les anastomoses artérielles, ou collatérales, constituent un système complexe de vaisseaux, dont l'objectif est de pouvoir suppléer la vascularisation d'un territoire cérébral en cas d'ischémie ou d'hypoperfusion. Au 19<sup>ème</sup> siècle, Heubner fut le premier à décrire l'existence de ces suppléances artérielles entre les ACA, ACM et ACP sous le nom d'anastomoses leptoméningées. Elles existent donc de manière constitutionnelle mais peuvent également se développer au cours de processus ischémiques chroniques. On distingue les collatérales proximales au niveau des artères de la circulation cérébrale, les collatérales distales au niveau des artérioles, et les collatérales entre la circulation intra- et extra-crânienne (Figure 3).<sup>51</sup>

La circulation collatérale extra-crânienne naît de branches de la carotide externe.<sup>52</sup> La circulation collatérale intracrânienne proximale se compose du polygone de Willis et fait communiquer la circulation cérébrale antérieure (artères carotides internes) avec la circulation cérébrale postérieure (artères vertébrales et tronc basilaire). Les ACA sont anastomosées par une artère communicante antérieure, les ACM et ACP par les artères communicantes postérieures<sup>47</sup>. Au niveau de la fosse postérieure, les artères vertébrales se rejoignent pour former le TB. Ce dernier donne naissance aux ACP et aux artères cérébelleuses.

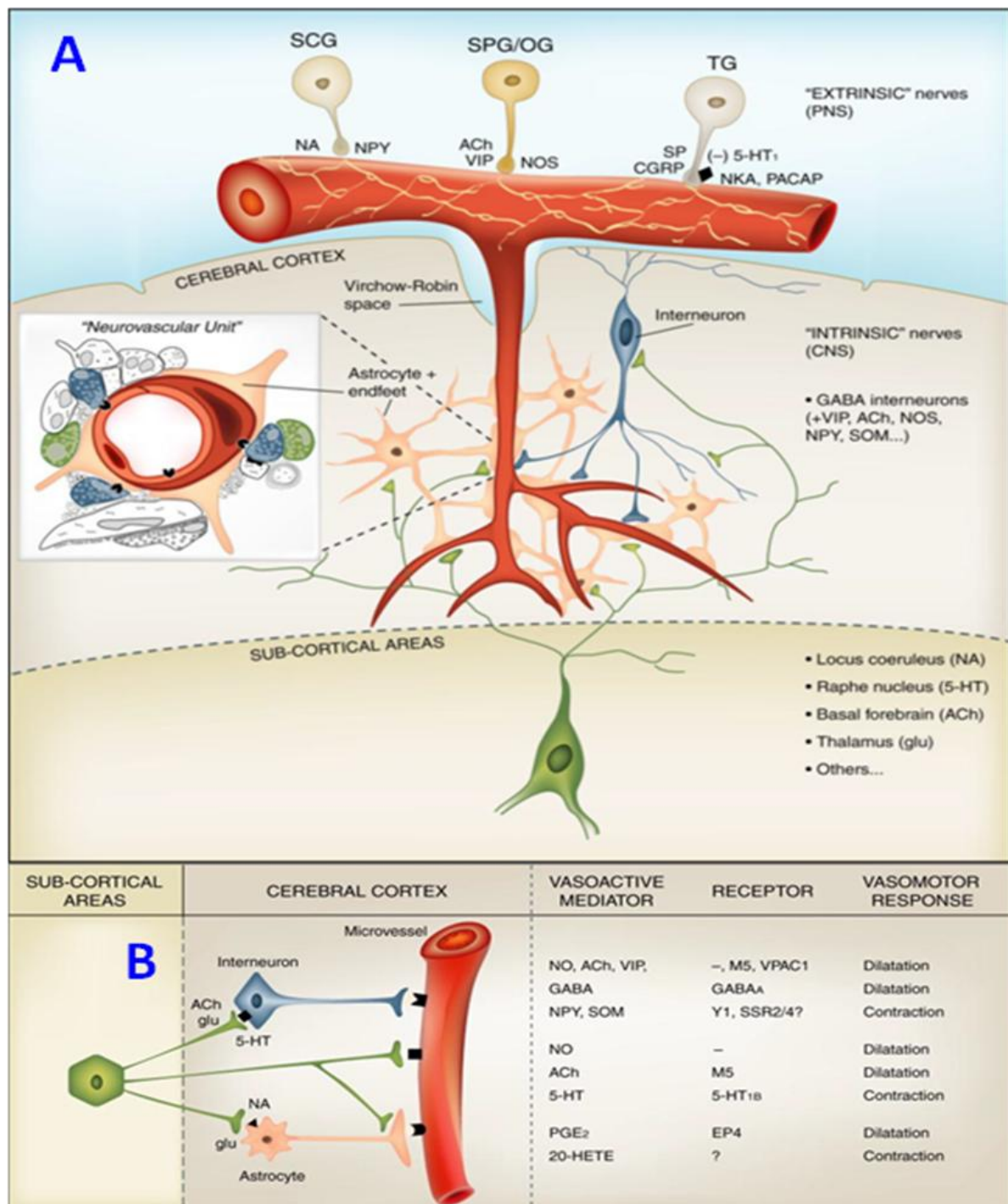
Les collatérales intracrâniennes distales (artérioles piales) font communiquer des branches de l'ACA avec celles de l'ACM (Figure 3), ainsi que des branches de l'ACP et de l'ACM. Les

collatérales de l'ACA suppléent plutôt les branches supérieures et antérieures de l'ACM; les collatérales de l'ACP suppléent les branches postérieures et inférieures de l'ACM.<sup>52</sup> Les collatérales jouent un rôle majeur lors de processus ischémiques: elles permettent de limiter la gravité de l'hypoperfusion. Par exemple en cas d'occlusion de l'ACM, le flux sanguin peut être détourné vers les collatérales distales, et par perfusion rétrograde, restaurer partiellement le débit sanguin tissulaire du territoire sylvien (Figure 4).<sup>53, 54</sup> Le polygone de Willis est la principale boucle anastomotique du réseau artérielle mais ne semble complet que chez 25% des patients.<sup>55, 56</sup> L'étude des collatérales dans les modèles animaux doit prendre en compte les différences anatomico-fonctionnelles spécifiques de l'espèce, rendant parfois délicate l'extrapolation chez l'homme. Chez le rat par exemple, l'anatomie vasculaire cérébrale diffère par la présence d'une seule artère cérébrale antérieure.<sup>53</sup>

En dehors de l'anatomie de ce réseau anastomotique, d'autres facteurs peuvent influencer l'efficacité du réseau collatéral au cours et au décours de l'ischémie. La pression de perfusion cérébrale semble être le facteur déterminant du recrutement des collatérales.<sup>57</sup> Les travaux effectués chez l'animal montrent l'implication de facteurs comme la variabilité interindividuelle, la perfusion cérébrale, l'âge, la présence d'un œdème cérébral, le modèle expérimental et l'espèce utilisés, ainsi que les facteurs génétiques.<sup>53, 58-60</sup> Néanmoins, les modèles expérimentaux d'AVCi montrent une relation forte entre le nombre, la densité, le diamètre des collatérales et le volume de l'infarctus (Figure 5).<sup>61, 62</sup>

Chez l'homme les techniques modernes d'imagerie permettent d'appréhender le recrutement de ce réseau collatéral au cours de l'ischémie. La qualité du recrutement des collatérales au cours d'un AVCi a été évalué par angiographie-IRM.<sup>63</sup> Chez 44 patients, l'importance du recrutement des collatérales était inversement proportionnel au volume de l'infarctus. Le Doppler transcrânien permet d'étudier la qualité de la perfusion des artères cérébrales. Silvestrini et al. ont étudié cette reperfusion à 24 heures d'un AVC ischémique consécutif à une dissection carotidienne. Les résultats ont montré que le nombre de collatérales recrutées était un facteur de bon pronostic neurologique à long terme.<sup>64</sup>

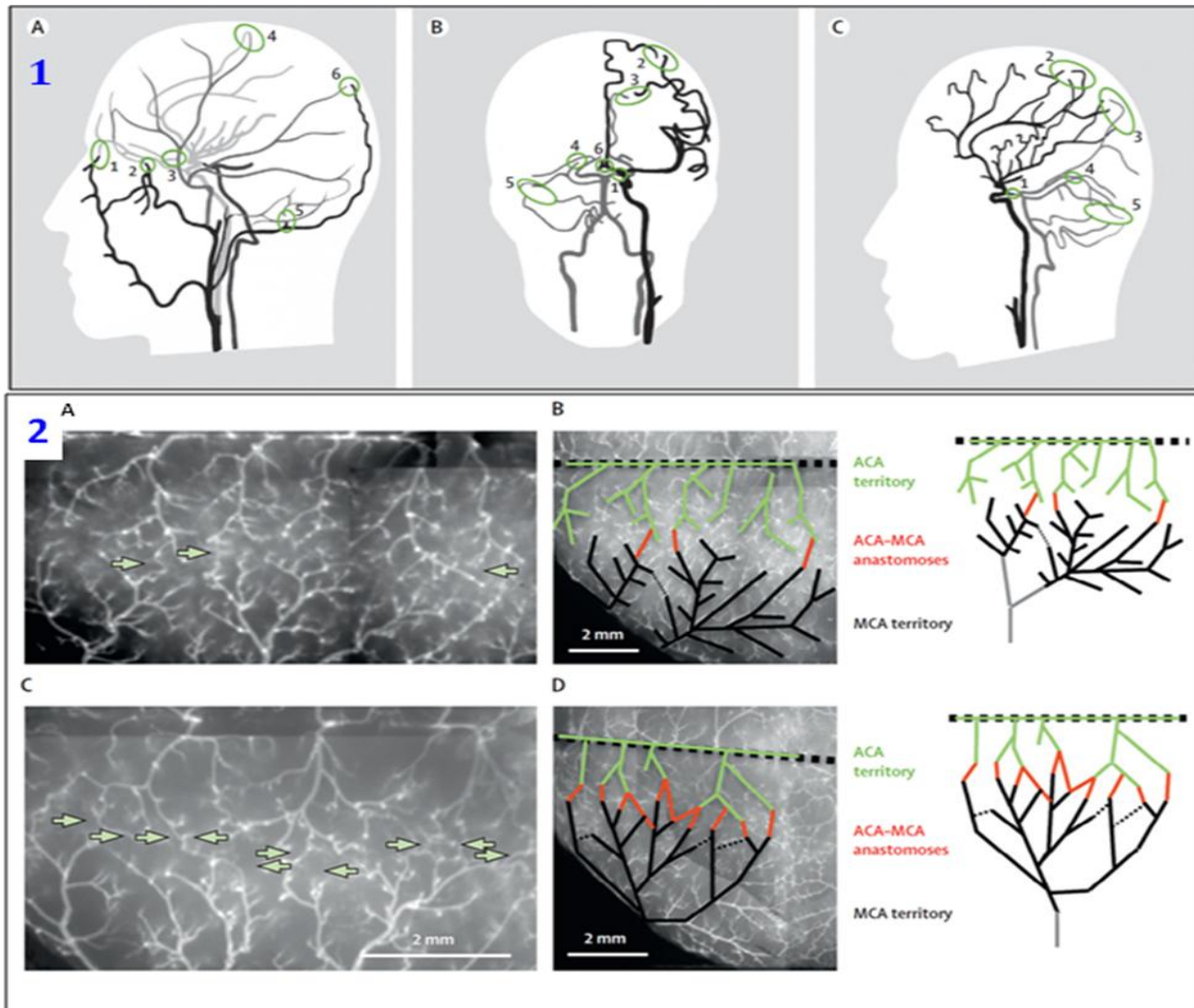




**Figure 2**

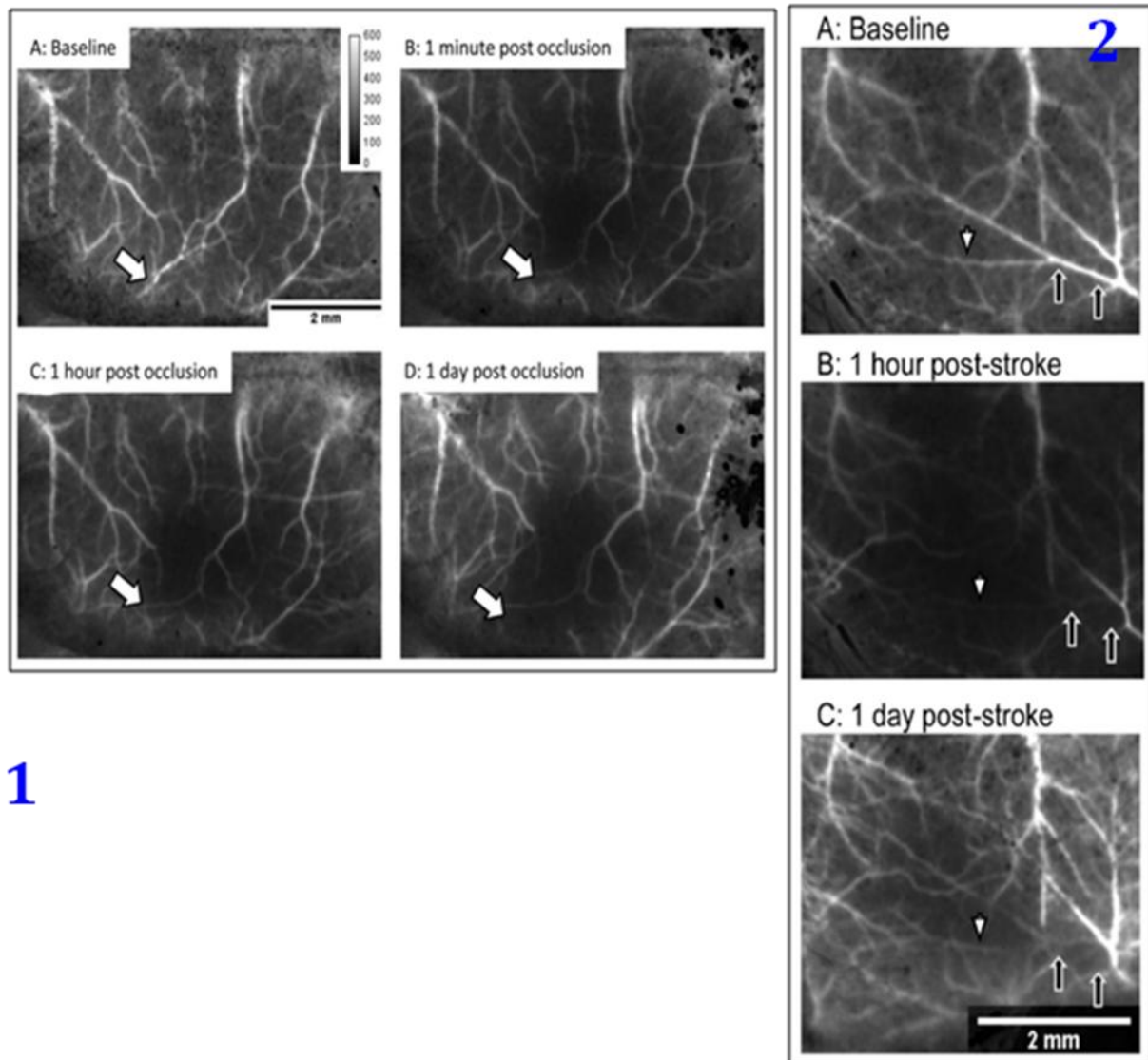
**Représentation de l'innervation périvasculaire au sein de l'Unité Neurovasculaire (UNV) et médiateurs vasoactifs sur la microcirculation cérébrale** (Hamel E., J Appl Physiol 2006) **A- L'innervation «extrinsèque»** des vaisseaux sanguins cérébraux proviennent du système nerveux périphérique (SNP) à partir soit des ganglions cervicaux supérieurs (GCS), soit des ganglions sphéno-palatins (SPG), des ganglions otiques (OG) ou trigéminal (TG). Les vaisseaux sanguins situés dans le parenchyme cérébral (microcirculation cérébrale) possèdent une innervation «intrinsèque» qui trouve son origine dans le système nerveux central (SNC). **B- La régulation par l'innervation intrinsèque** de la microcirculation se fait à partir de cellules situées dans les régions sous-corticales et dans le cortex cérébral. Les interneurons pourraient

induire la libération de molécules vasoactives, mais ceci n'est pas si clair. Les principaux médiateurs vasoactifs, connus ou possibles, sont représentés sur le dessin. Les récepteurs PGE2 sont soupçonnés de provoquer une dilatation, les 20-HETE plutôt une vasoconstriction. Le GABA est un médiateur vasodilatateur, par l'intermédiaire de récepteurs GABA-A, les récepteurs muscariniques M5 interviennent dans la dilatation des petits vaisseaux cérébraux. ACh, acétylcholine; CGRP, calcitonine gene-related peptide; GABA, -aminobutyric acid; NA, norépinephrine; NKA, neurokinin A; NOS, nitric oxide synthase; NPY, neuropeptide Y; PACAP, pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide; SOM, somatostatin; SP, substance P; VIP, vasoactive intestinal polypeptide; 5-HT, sérotonine, PGE2, Progestérone E2



**Figure 3**

**La circulation cérébrale collatérale chez l'homme (1) et un exemple chez la souris C57BL/6J et BALB/c à P6** (Shvaid A, Liebeskind DS, Lancet Neurology 2011) **A- La circulation collatérale extracrânienne chez l'homme.** Ici sont représentées les anastomoses de l'artère faciale (1), de l'artère maxillaire (2), et de l'ACM (3) avec l'artère ophtalmique, et des anastomoses dures avec l'artère méningée moyenne (4), de l'artère occipitale à travers le trou mastoïdien (5) et le foramen pariétal (6). La circulation collatérale est représentée en coupe frontale (B) et en coupe latérale (C). L'artère communicante postérieure (1); les anastomoses leptoméningées antérieures avec l'ACM (2), entre l'ACP et l'ACM (3), entre l'ACP et les artères cérébelleuses supérieures (4); les anastomoses distales entre les artères cérébelleuses (5), et de l'artère communicante antérieure (6). **B- Les anastomoses périphériques de la pie-mère chez la souris de l'ACM avec l'ACA** sont identifiés par des flèches (A,C). Une technique de marquage des vaisseaux a été utilisée (A,B,C et D) (DeFazio RA, *Transl Stroke Res* 2011) pour quantifier les connexions pie-mériennes chez la souris C57BL/6J (D) et chez la souris BALB/c (B). Les anastomoses entre les collatérales de l'ACA et de l'ACM sont plus développées chez la souris C57BL/6J. ACA = artère cérébrale antérieure. ACM= artère cérébrale moyenne. Adapté de DeFazio.

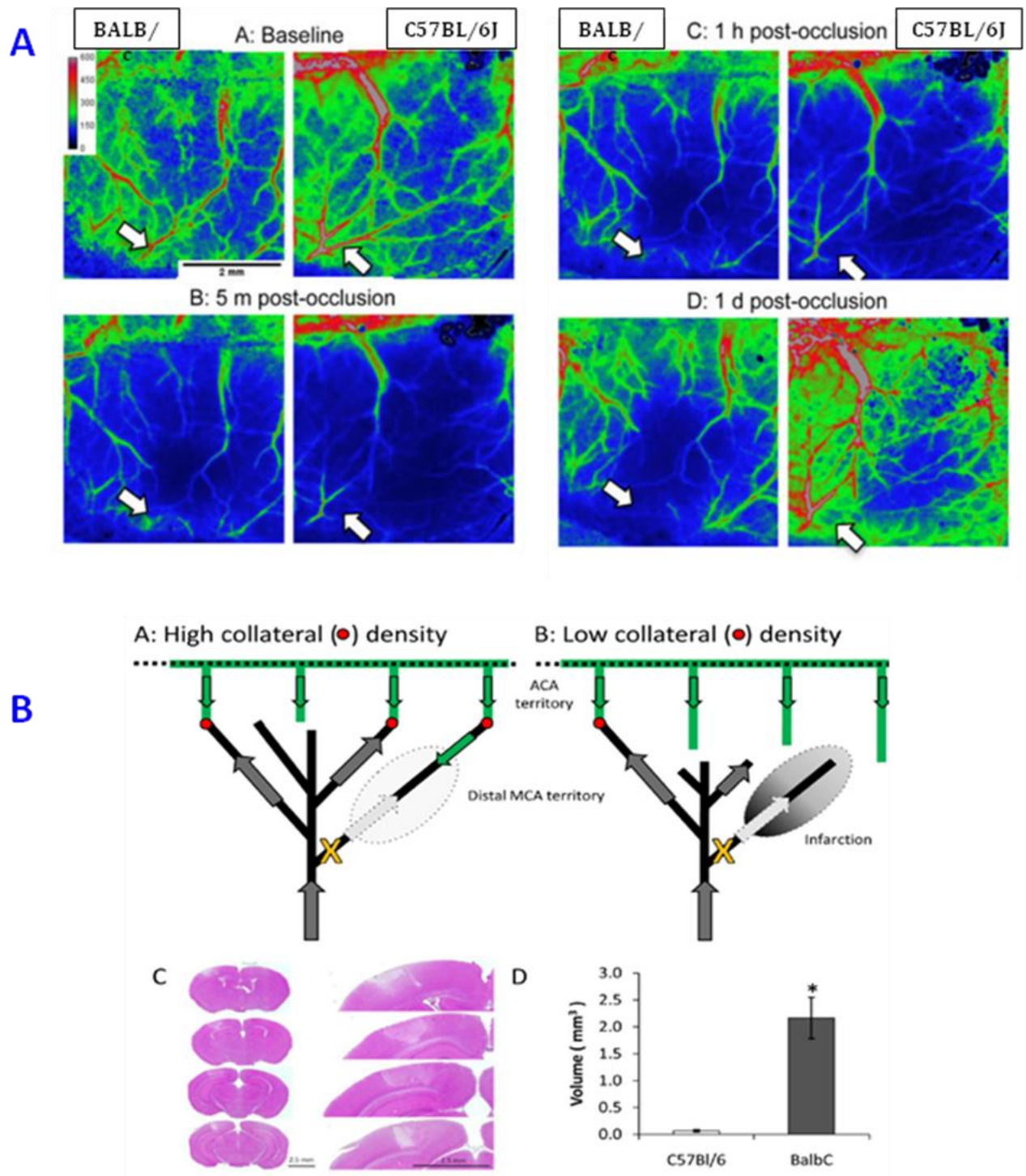


**Figure 4**  
**Images Laser Doppler de perfusion au décours d'une occlusion de l'ACM chez la souris BALB/c et C57BL/6J (DeFazio RA, Transl Stroke Res 2011)**

**A - Images Laser speckle chez la souris BALB/c.** Les zones à flux élevés en blanc représentent les vaisseaux cérébraux corticaux, les zones à bas flux sont en noires. Au niveau basal (A), l'ACM est représentée par la flèche blanche. Après l'occlusion de l'ACM, le flux n'est plus visualisable dans l'ACM (B). L'absence de collatérale se traduit par la non reperfusion de l'ACM après 1h (C) ou 24h (D).

**B- Reperfusion rétrograde chez la souris C57BL/6J.** Au niveau basal (A). Les flèches noires délimitent la zone d'extension de l'ischémie après occlusion définitive par laser de l'ACM (A, B et C). Une heure après l'occlusion, le signal laser speckle ne montre aucune reperfusion dans la zone à risque (B). Après 24h d'occlusion, une reperfusion rétrograde est visualisée dans la zone à risque, sans que le site d'occlusion de l'ACM n'ait été revascularisé (pas de perfusion antérograde). ACM= Artère cérébrale moyenne,





**Figure 5**  
**Reperfusion chez la souris BALB/c et C57BL/6J (DeFazio RA, Transl Stroke Res 2011)**

**A- Reperfusion en Images couleurs obtenues par Laser doppler de perfusion (laser speckle).** Les flèches blanches montrent le site d'occlusion par laser de l'ACM. La reperfusion tissulaire dans la zone à risque est meilleure chez les souris C57BL/6J à 1h (C) et surtout à 24h (D) que chez les souris BALB/c.

**B- Représentation schématique des collatérales distales de l'ACM chez les souris C57BL/6J et BALB/c et du phénomène de reperfusion rétrograde (A et B).** Les lésions ischémiques sont significativement réduites chez les souris C57BL/6J grâce à la collatéralité (D). Lésions histologiques en coupes hématoxyline et éosine (C). MCA=ACM=Artère cérébrale moyenne

### 1.2.2 -- Régulation de la perfusion cérébrale

Le cerveau est un organe dépendant d'un métabolisme aérobie pour son fonctionnement et intolérant quant à l'ischémie. Toute réduction du DSC peut entraîner rapidement des conséquences irréversibles. Le cerveau a mis en place un certain nombre de systèmes de régulation et de protection afin de limiter les risques de chute brutale du DSC.<sup>48</sup>

Premièrement, le système nerveux central contrôle la régulation du débit sanguin systémique par l'intermédiaire du système cardiovasculaire. Selon les situations, il peut ainsi redistribuer le débit sanguin systémique vers les circulations régionales en privilégiant les organes « nobles » comme le cerveau et le cœur. Deuxièmement, il limite les variations du DSC au cours de modifications aiguës de la pression artérielle (physiologiques ou pathologiques). Ce phénomène s'appelle « autorégulation cérébrale ». Troisièmement, le cerveau adapte en fonction des situations le DSC aux besoins métaboliques cérébraux. Ce mécanisme est appelé « couplage neurovasculaire ».

La régulation du DSC est ainsi sous le contrôle de la microcirculation cérébrale, qui intègre plusieurs niveaux d'informations (vaisseaux sanguins, neurones, synapses, microglie, afférences nerveuses périvasculaires). Le compartiment intravasculaire (globule rouge, leucocytes, plaquettes, protéines de la coagulation) interagit de manière complexe avec l'endothélium vasculaire et participe aussi à la régulation du DSC. Les globules rouges influencent la vasodilatation par effet rhéologique local, comme l'O<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub>.<sup>65</sup> L'endothélium vasculaire intègre les signaux vasomoteurs en provenance des synapses, des fibres nerveuses périvasculaires et des astrocytes.<sup>66, 67</sup> Les cellules musculaires lisses artériolaires et les péricytes capillaires sont les cellules effectrices du tonus vasculaire.<sup>68</sup> L'UNV est l'élément central dans la mise en œuvre de l'autorégulation cérébrale (ARC) et du couplage neurovasculaire (CNV). Nous détaillerons spécifiquement ces concepts plus avant.

#### 1.2.2.1 -- Principes hémodynamiques

Le DSC dépend de la pression de perfusion cérébrale et des RVC. La pression de perfusion cérébrale est la différence entre la pression artérielle moyenne et la pression veineuse centrale [DSC= (PAM-PVC)/RVC]. Les RVC ne sont pas facilement mesurables en routine. Elles dépendent essentiellement du rayon du vaisseau. La microcirculation cérébrale (artérioles et veinules) est le système régulateur du DSC. Si ce rayon varie peu, alors la vitesse du sang dans le vaisseau (ou vélocité sanguine) mesurée au niveau d'une artère cérébrale est proportionnelle au débit sanguin dans cette artère (technique du Doppler ultrasons). Cet élément explique l'intérêt porté au Doppler ultrasons pour l'évaluation de la perfusion cérébrale.

Le DSC est également dépendant du débit cardiaque. Le débit cardiaque peut aussi être exprimé par le produit de la fréquence cardiaque par le volume d'éjection systolique du ventricule gauche. Chez le nouveau-né, comme la fonction inotrope du cœur est très peu variable, même en situations pathologiques, la fréquence cardiaque reste alors le seuil moyen pour augmenter le débit cardiaque. La fréquence cardiaque est alors directement proportionnelle au débit cardiaque.

Enfin, le DSC s'adapte aux besoins métaboliques en oxygène et en glucose des cellules cérébrales. Le DSC peut donc être mesuré par des techniques sophistiquées de mesures de la consommation en ml d'O<sub>2</sub> ou en mg de glucose /min/100g de tissu cérébral.

#### 1.2.2.2 -- Unité Neurovasculaire

Les artérioles et les capillaires cérébraux entrent en étroite relation avec les neurones et les astrocytes. Ils composent ensemble une structure anatomico-fonctionnelle appelée unité neurovasculaire (UNV) (Figure 2) dont les principales fonctions sont le maintien de l'homéostasie cérébrale et la coordination « besoins métaboliques-réponse vasomotrice » correspondant à la notion de couplage neurovasculaire.<sup>48</sup> Les mécanismes de régulation du tonus vasomoteur sont différents de ceux mis en œuvre au niveau de la macrocirculation (artères cérébrales).

La paroi vasculaire interne est constituée d'une couche de cellules endothéliales vasculaires non fenêtrées, c'est à dire qu'elles possèdent des interconnexions de type «jonctions serrées». La faible perméabilité de l'endothélium est une caractéristique importante du réseau artériel cérébral dans sa fonction de barrière hémato-encéphalique.<sup>69</sup> La paroi des artères piales est constituée d'une couche de cellules musculaires lisses puis d'une couche de cellules leptoméningées formant l'adventice (Figure 6). Les artérioles perdent l'essentiel de leur paroi musculaire lisse et la couche leptoméningée. L'endothélium n'est plus entouré que d'une seule couche de cellule musculaire lisse, et se retrouve en contact avec les prolongements astrocytaires (pieds), les interneurones et les axones d'origine sous-corticale (innervation intrinsèque). Au niveau des capillaires, les cellules musculaires lisses ont totalement disparues, au profit de péricytes. L'UNV est formée d'une synapse corticale, d'un microvaisseau (artériole ou capillaire), et des prolongements terminaux astrocytaires appelés « pieds astrocytaires » en contact étroit avec les structures vasculaires (Figure 2). D'autres structures interviennent ensuite dans le fonctionnement et la régulation de l'UNV comme des interneurones ou des projections axonales en provenance d'aires sous-corticales.

Les fonctions contrôlées par l'UNV sont multiples, en particulier la régulation de l'homéostasie locale, et surtout la régulation temporelle et spatiale du DSCr selon l'activité électrique neuronale. Cette adaptation continue et en temps réel du DSCr est une nécessité pour un organe ayant peu de réserves énergétiques. Le cerveau a une dépendance énergétique

permanente et totale, asservie à la perfusion cérébrale. La relation d'asservissement du DSC aux besoins métaboliques est appelé couplage neurovasculaire (CNV).

Depuis le 19ème siècle, les travaux d'électrophysiologie ont permis de mettre en évidence cette relation « DSCr-activité électrique corticale ». Angelo Mosso, médecin italien, avait montré qu'un stimulus émotionnel augmentait l'activité cérébrale puis le volume sanguin cérébral.<sup>70</sup> Par la suite, ces résultats ont été confirmés.<sup>71</sup> Dans les années 1960, les travaux du chercheur suédois Lassen a ont montré que le DSC était asservie à l'activité électrique cérébrale.<sup>72, 73</sup> Les progrès techniques permettent actuellement de monitorer le DSC: imagerie par résonance magnétique, tomographie par émission de positron, méthode doppler ultrasonique et méthode Laser doppler de perfusion.<sup>74, 75</sup> Les mécanismes contrôlant le DSC au niveau de la microcirculation restent imparfaitement connus, mais le rôle central de l'UNV semble assez largement partagé par les scientifiques.<sup>48</sup> Les travaux actuels montrent l'UNV permet la régulation du DSC dans les situations physiologiques amis également pathologiques, et en particulier au cours de l'ischémie.<sup>76,</sup>  
77

#### 1.2.2.2.1 Une organisation en réseau

La transmission synaptique génère des « signaux » en rapport avec l'activité neuronale. Les signaux neuronaux peuvent être d'origine synaptique ou post-synaptique. Ils sont transmis par l'intermédiaire de voies de signalisation intracellulaires et intercellulaires (Figure 7). En même temps que le neurone postsynaptique se dépolarise, l'afflux calcique NMDA-dépendant active la voie de signalisation de la NOS neuronale (nNOS)<sup>78</sup> et de la CoX pour la synthèse de prostaglandines.<sup>79, 80</sup> Ces médiateurs vasodilatateurs diffusibles vont agir sur les parois vasculaires.<sup>81</sup> Les astrocytes intègrent aussi les stimuli en provenance de leurs connections dendritiques et des autres astrocytes. Les astrocytes envoie ensuite des messages par différentes voies de signalisation aux cellules effectrices de l'UNV afin d'aboutir in fine à l'induction d'une réponse vasomotrice spécifique.<sup>82</sup> Certains neuromédiateurs post-synaptiques peuvent agir directement sur les structures vasculaires. Les microvaisseaux envoient aussi des signaux de feed-back. Le sens de l'information est donc bidirectionnel. Les mécanismes de rétrocontrôles restent mal compris. Enfin, le système d'innervation périvasculaire joue un rôle modulateur et modérateur sur la fonction vasomotrice des microvaisseaux.



#### 1.2.2.2.2 Astrocyte

Les astrocytes sont les cellules de soutien du tissu cérébral. Elles possèdent de nombreuses fonctions en particulier au sein de la BHE. Elles coordonnent les relations intercellulaires entre les microvaisseaux et les neurones. Elles ont une place centrale dans l'UNV, dans la régulation dynamique du DSC et la régulation de l'activité neuronale.<sup>83</sup> Les astrocytes entretiennent des connections étroites avec les microvaisseaux par l'intermédiaire d'une interface glio-vasculaire.<sup>84</sup> Ils reçoivent des informations en provenance des synapses et du milieu extracellulaire (Figure 7). Le glutamate est le principal neuromédiateur impliqué dans les processus de CNV. Par l'intermédiaire de récepteurs membranaires mGluR des astrocytes, le glutamate active une phospholipase C, qui induit une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire a un rôle central dans l'activation de médiateurs du CNV. D'autres voies comme celle de l'adénosine augmentent également la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>85</sup> Les astrocytes propagent ces ondes calciques jusqu'aux zones d'interface glio-vasculaire. Le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire stimule la phospholipase A2 responsable d'une dégradation de l'acide arachidonique. Cette dégradation donne deux voies différentes selon les enzymes impliquées : soit la production de prostaglandine PGE2 via la cyclooxygénase (CoX), soit des molécules de type acides époxyeicosatriénoïques (EET) via le cytochrome P450.<sup>86</sup> Ces médiateurs diffusent ensuite vers les cellules musculaires lisses. Elles provoquent une hyperpolarisation de la cellule grâce à la facilitation de l'ouverture de canaux  $\text{K}^+$ . Ce mécanisme est responsable d'une vasodilatation.

La voie de signalisation induite par le  $\text{K}^+$  est une voie importante dans le CNV (Figure 7). La transmission synaptique est responsable d'une libération de  $\text{K}^+$  dans le milieu extracellulaire faisant suite à la dépolarisation membranaire. Le  $\text{K}^+$  extracellulaire pénètre dans les astrocytes au niveau de la synapse, passivement par les canaux Kir ou de manière active par les pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  réparties sur les membranes astrocytaires. Ensuite le  $\text{K}^+$  semble être concentré au niveau de l'interface glio-vasculaire. Sa libération préférentielle au niveau de l'interface glio-vasculaire fait intervenir des canaux  $\text{K}^+$  de haute perméabilité et  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>87</sup> Les pieds astrocytaires sont riches en ces canaux  $\text{K}^+$ -voltage-dépendant ou  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant qui facilitent la transmission de l'information aux cellules musculaires lisses.<sup>88, 89</sup> Le relargage du  $\text{K}^+$  dans l'espace glio-vasculaire induit ainsi un effet vasodilatateur.<sup>90</sup> Le  $\text{K}^+$  extracellulaire agit aussi directement sur les cellules musculaires lisses vasculaires via l'ouverture de canaux  $\text{K}^+$  membranaires.<sup>91</sup> Ces canaux  $\text{K}^+$  sont largement répartis sur les membranes autour des synapses et au niveau des parois vasculaires. L'entrée de  $\text{K}^+$  dans les cellules musculaires lisses provoque une hyperpolarisation, puis une myorelaxation et finalement la vasodilatation.<sup>92, 93</sup>

Les astrocytes sont également en connections avec des interneurons excitateurs et inhibiteurs.<sup>94</sup> Les molécules libérées au niveau de l'interface « interneurone-astrocyte » peuvent induire un effet vasoconstricteur (somatostatine, NPY) ou plutôt vasodilatateur (NO, VIP). D'autres neuromédiateurs sont libérés par différents interneurons (Dopamine, noradrénaline, Ach, GABA). Les astrocytes intègrent toutes ces informations et modulent ainsi l'effet vasomoteur final.

#### 1.2.2.2.3 Cellule endothéliale vasculaire

Au niveau de la microcirculation cérébrale, la paroi vasculaire interne se compose d'une couche de cellules endothéliales vasculaires. Elle constitue l'interface vasculaire de la BHE. Cet endothélium possède des caractéristiques spécifiques de jonction intercellulaires de type serrées dont le rôle est important pour les fonctions d'imperméabilité de la BHE. L'endothélium est en relation avec les éléments figurés du sang (globules rouges, leucocytes, plaquettes) et les protéines plasmatiques. Les interactions « endothélium-sang » limitent le passage des cellules et protéines hors des vaisseaux. L'endothélium contrôle le transit des molécules énergétiques, des nutriments et des substances toxiques vers les neurones et la glie. Il possède à sa surface de nombreux transporteurs spécifiques pour les ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ), les peptides (acides aminés) et les nutriments (lactate, glucose).<sup>95</sup>

L'endothélium est un site important de synthèse de médiateurs vasoactifs (Figure 2). en particulier la synthèse et la libération de NO.<sup>92</sup> Les principaux médiateurs vasoactifs synthétisés sont le NO, les prostaglandines, et l'endothéline.<sup>96</sup> Le NO est synthétisé grâce à une NO-Synthase (NOS) d'origine endothéliale (eNOS). D'autres NOS ont été mis en évidence, neuronale (nNOS) et inducible (iNOS). Le NO diffuse facilement dans les cellules musculaires lisses. Il agit sur la guanylate cyclase qui permet la synthèse de GMP cyclique. Le GMPc est responsable d'une relaxation des fibres musculaires lisses (voie de signalisation PKG, ouverture canaux  $\text{K}^+$ , sortie de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Les inhibiteurs du NO ré-versent cet effet vasodilatateur.<sup>97</sup> Le NO est également impliqué dans la transmission du signal de vasodilatation rétrograde par diffusibilité vers les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses adjacentes (Figure 6).<sup>48</sup> L'acide arachidonique est un précurseur de plusieurs médiateurs vasoactifs de type prostaglandines. La CoX dégrade l'acide arachidonique en prostaglandine PGE2 et PGI2. Ces médiateurs sont diffusibles et induisent une vasodilatation. Enfin, l'endothéline (ET) est une substance vasoactive également synthétisée par les cellules endothéliales. Elle possède plusieurs isoformes dont l'ET-1 est le plus répandu au niveau des microvaisseaux cérébraux. En situation physiologique, elle induit une vasodilatation.

#### 1.2.2.2.4 Péricytes

Les péricytes sont des cellules d'origine probablement mésodermique, localisées au niveau des artérioles précapillaires et les capillaires, entre la membrane basale interne et externe de l'endothélium vasculaire (Figure 6). Elles couvrent 20 à 30% de la surface totale des capillaires cérébraux. Les péricytes sont en contact avec pieds astrocytaires.<sup>98, 99</sup> Les péricytes se distribuent de manière longitudinale par rapport au vaisseau. Leur densité semble plus importante au niveau des artérioles précapillaires.<sup>100</sup> Comme les cellules musculaires lisses, ils possèdent une fonction contractile.<sup>101</sup> Leur rôle dans la régulation du tonus vasomoteur local reste cependant controversé et variable en fonction des modèles expérimentaux.<sup>68</sup> Les péricytes ont un rôle fonctionnel dans de BHE et dans l'angiogénèse<sup>102</sup>, de phagocytose et de migration au cours du développement.<sup>98</sup>

#### 1.2.2.2.5 Innervation périvasculaire

Les artérioles cérébrales possèdent une innervation périvasculaire sympathique et parasympathique participant à la régulation du tonus vasomoteur. L'innervation périvasculaire, dite extrinsèque, provient du système nerveux périphérique. Ces fibres nerveuses courent à la surface des artérioles. Leur densité diminue lorsque les artérioles pénètrent dans les espaces de Virchow-Robin. Les nerfs sympathiques et parasympathiques naissent des ganglions cervicaux supérieurs, sphéno-palatins, otiques (Figure 2). L'innervation périvasculaire permet de protéger le cerveau lors de poussées hypertensives par un phénomène vasoconstriction réactionnelle<sup>103</sup>. Le système sympathique limite ainsi les effets délétères induit par l'HTA en termes d'altération de la BHE puis d'œdème vasogénique.<sup>104</sup> En conditions ischémiques la réponse induite par le système parasympathique est inverse: une vasodilatation est responsable de l'augmentation du DSC. Ce phénomène tend à limiter l'hypoperfusion.<sup>105</sup> Les nerfs libèrent des substances qui influencent la vasoréactivité (NO, Noradrénaline, VIP, Acétylcholine, sérotonine).<sup>94</sup> Les artérioles possèdent également une innervation d'origine "sensorielle" à partir de fibres nerveuses provenant du ganglion trigéminal. Le rôle du système trigéminal, en dehors des situations pathologiques des migraines<sup>106</sup> en situations physiologiques est mal connu. Leur action est essentiellement vasodilatatrice par libération de substance P (SP), neurokinine A (NKA) et Calcitonin-gene related peptide (CGRP).

L'innervation périvasculaire dite intrinsèque provient d'aires sous-corticales, du Locus Coeruleus, du Raphe Nucleus. Ces fibres nerveuses se projettent sur la paroi des microvaisseaux et sur les astrocytes. Elles libèrent aussi des neuromédiateurs vasodilatateurs comme le NO et l'ACh, ou bien vasoconstricteurs comme la NA ou la sérotonine, qui agissent sur des récepteurs spécifiques sur les cellules endothéliales ou sur les fibres musculaires lisses vasculaires.<sup>94</sup>

L'innervation intrinsèque provient également d'interneurones locaux qui entretiennent des connexions avec les microvaisseaux. Ces interneurones semblent avoir un phénotype «vasomoteur». Ils peuvent libérer des médiateurs vasoactifs au niveau de la paroi vasculaire (Figure 7). Ces interneurones GABAergiques peuvent sécréter des médiateurs vasodilatateurs (NO, Ach, VIP) ou vasoconstricteurs (NPY, somatostatine) selon les circonstances.<sup>107</sup> Les interneurones possèdent des connexions avec les fibres nerveuses intrinsèques sous-corticales, qui modulent leur action. Ces interneurones semblent jouer un rôle modulateur des multiples afférences de l'UNV.

L'innervation périvasculaire intervient dans le CNV.<sup>94</sup> L'organisation des connections entre les neurones et l'UNV est complexe. Les connections se font majoritairement sur les pieds astrocytaires au niveau l'interface glio-vasculaire, et accessoirement de manière directe avec les microvaisseaux. Les neurones sous-corticaux peuvent également se projeter sur des interneurones. Leurs synapses sont activatrices ou inhibitrices. Les neuromédiateurs sécrétés sont nombreux : noradrénaline, dopamine, acétylcholine, sérotonine, substance P, GABA, NO, VIP sont les principaux.<sup>48, 108</sup> Les interneurones ont un rôle régulateur de l'information astrocytaire.<sup>107, 109</sup> Ils peuvent aussi co-localiser plusieurs neuromédiateurs différents, et peuvent moduler l'excrétion de chacun selon les situations.<sup>107</sup> Le résultat est donc, en termes de tonus vasomoteur, souvent complexe. Les voies de signalisation passent par une modification du taux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Dans tous les cas, l'intégrité du système d'innervation périvasculaire est indispensable à l'efficacité du CNV.

En résumé, l'innervation périvasculaire joue un rôle fondamental dans l'adaptation du DSC, en permettant la libération de médiateurs vasodilatateurs (NO, GABA, PGE2, Acétylcholine) et de médiateurs vasoconstricteurs (noradrénaline, sérotonine, VIP, Neuropeptide Y) par l'endothélium vasculaire. Cet endothélium est le site de régulation du tonus vasomoteur. Enfin, les aires sous-corticales modulent l'expression des réponses vasculaires par les interneurones.<sup>94</sup>

#### 1.2.2.2.6 Cellule musculaire lisse vasculaire

La cellule musculaire vasculaire est l'effecteur principal de l'UNV. Elle est la cible finale de tous les mécanismes vasomoteurs activés par la synapse, les astrocytes, les cellules endothéliales, les neurones sous-corticaux et les interneurones (Figure 7). Le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire agit sur la régulation de l'activité des phosphatases et des kinases qui agissent sur les chaînes légères de myosine, et ainsi contrôle la balance entre contraction et relaxation des fibres musculaires lisses. Les oscillations de concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire sont influencées par la GMPc, l'AMPc, les canaux  $\text{Ca}^{2+}$ -voltage dépendant membranaires, la voie de la phospholipase C.<sup>110</sup> Le NO active des canaux  $\text{K}^+$ -ATP-dépendant qui favorisent la sortie du  $\text{K}^+$ , puis

l'hyperpolarisation et enfin secondairement la vasodilatation par augmentation du taux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Le NO active également de manière directe sur la guanylate cyclase. Le GMPc provoque une diminution du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. L'effet final du NO est une vasodilatation suite à la déphosphorylation de la myosine.<sup>48, 111</sup>

Les canaux  $\text{K}^+$  sont impliqués dans la régulation du tonus des fibres musculaires lisses (Figure 8). On distingue 5 types principaux de canaux  $\text{K}^+$  membranaires: Kir,  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant, Voltage-dépendant, ATP-dépendant et BK. Ces canaux sont exprimés différemment selon les vaisseaux et les situations. Les astrocytes libèrent du  $\text{K}^+$  vers le milieu extracellulaire grâce à des canaux  $\text{K}^+$  membranaires de type BK localisés au niveau de l'interface glio-vasculaire. L'augmentation du  $\text{K}^+$  extracellulaire est un déterminant du potentiel de membranes des cellules musculaires lisses. Cette augmentation du potentiel membranaire agit sur l'activité et la densité des canaux Kir à la surface des cellules musculaires lisses.<sup>112</sup> Les canaux Kir sont fonctionnellement couplés à des canaux membranaires calciques voltage dépendant (VDCC). Lorsque l'augmentation du potentiel de membrane est faible, les canaux Kir sont recrutés et libèrent du  $\text{K}^+$ . Ceci s'accompagne d'une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses.<sup>113</sup> Alors, l'ouverture des canaux VDCC est responsable d'une diminution de la concentration  $\text{Ca}^{2+}$  provoquant la déphosphorylation des protéines de myosine et une relaxation des fibres musculaires.<sup>112</sup> A l'inverse, si le potentiel membranaire augmente très fortement, la résultante est une dépolarisation membranaire, et donc un effet de contraction des fibres musculaires lisses, et une vasoconstriction. Les enzymes calcique-dépendantes sont très sensibles à de faibles modifications des concentrations  $\text{Ca}^{2+}$ . Les autres canaux  $\text{K}^+$  influencent également la régulation du tonus vasomoteur basal des cellules musculaires lisses.

#### 1.2.2.3 -- Modèle de vasodilatation rétrograde

La physiologie de la réponse vasomotrice semble désormais relativement bien comprise. Comme nous venons de la voir, le signal régulateur du tonus vasomoteur naît de l'intégration de plusieurs sources d'informations: endovasculaire, endothélium, astrocytes, innervation périvasculaire, activité neuronale et synaptique.<sup>48</sup> Ensuite, les informations sont intégrées et transformées localement en signal de vasodilatation ou de vasoconstriction, et mise en œuvre par les systèmes effecteurs de la paroi vasculaire (Figure 7 et 8). Les résistances vasculaires des artérioles intraparenchymateuses et des capillaires ne représentant que 40 à 50% des résistances vasculaires totales.<sup>48</sup> Comme le signal vasomoteur naît de la microcirculation, il faut bien que ce signal puisse remonter aux artères piales. Ce trajet rétrograde du signal de vasodilatation est appelé « vasodilatation rétrograde » (Figures 6B et C). Itoh et al. ont décrit ce modèle d'intégration proximal : la vasodilatation capillaire locale est transmise en amont à "son" artère piale afférente,

sans que soient modifiée la réponse vasomotrice des autres territoires en aval de l'artère piale considérée (Figure 6).<sup>68, 77</sup>

Ce concept dépend de signaux rétrogrades et antérogrades complexes. Les signaux vasodilatateurs rétrogrades sont encore mal décrits. Roseblum et al. avaient mis en évidence qu'une vasoconstriction locale par une injection d'uridine triphosphate diffusait en amont du point d'injection.<sup>114</sup> L'endothélium vasculaire est une nouvelle fois le point de départ pour la diffusion du signal.<sup>115, 116</sup> Parmi les mécanismes impliqués, les jonctions serrées ou « gap-junction » faciliteraient la conduction du signal.<sup>117</sup> L'endothélium propagerait, comme pour la dépolarisation des axones de proche en proche, un signal de vasodilatation entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, grâce aux jonctions serrées (Figure 6).<sup>118, 119</sup> La transmission du signal ferait intervenir une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses grâce à l'ouverture de canaux  $K^+$  membranaires.<sup>96</sup> Parmi les médiateurs impliqués, on retrouve le NO et les prostaglandines.<sup>48, 115</sup> La diffusion des médiateurs vasodilatateurs s'effectuerait de manière intramurale, par contiguïté entre les cellules musculaires lisses.<sup>120</sup> Les péricytes interviendraient également dans la transmission intramurale du signal.<sup>121</sup>

La réponse vasomotrice est dépendante des contraintes appliquées sur l'endothélium, soit par la pression artérielle soit par le débit sanguin. L'endothélium possède des récepteurs sensibles aux contraintes de cisaillement et aux contraintes d'étirement.<sup>122</sup> Ces contraintes « cisaillement-étirement » sur l'endothélium activent des voies de signalisation vasodilatatrices. L'endothélium possède des canaux  $Ca^{2+}$  sensibles à l'étirement.<sup>123</sup> Le  $Ca^{2+}$  intracellulaire augmente et favorise l'activation de la NOS. Le NO est ensuite synthétisé par l'endothélium en réponse à ces contraintes de cisaillement.<sup>124</sup> Des études récentes démontrent le lien mécanistique entre les contraintes « cisaillement-étirement » et la transmission rétrograde du signal vasodilatateur.<sup>125, 126</sup>

#### 1.2.2.4 -- Autorégulation cérébrale

L'ARC est un ensemble de mécanismes physiologiques qui permettent l'adaptation du DSC selon les conditions de pressions artérielles. Les conséquences sont des modifications du tonus vasomoteur cérébral.

Le DSC est régulé selon les conditions de pression de perfusion cérébrale.<sup>73, 127</sup> En pratique, l'ARC protège la microcirculation de brusques poussées hypertensives (risques d'œdème cérébral, d'hémorragies). Mais l'ARC existe aussi pour des valeurs abaissées des pressions de perfusion afin de protéger du risque d'ischémie. Il est important de retenir que le DSC n'est pas une valeur constante. Il faut donc bien différencier le concept d'ARC (relation « DSC – Pression de perfusion ») et le CNV (relation « DSC- consommation énergétique »).

Le plateau d'ARC détermine une zone de pression de perfusion cérébrale pour laquelle le DSC reste constant.<sup>73</sup> La microcirculation contrôle l'adaptation "fine" des RVC tandis que les artères cérébrales seraient davantage impliquées dans la régulation "d'urgences" lors de poussées hypertensives sévères.<sup>127</sup> En effet, La vasomotricité de la microcirculation est plus réactive que celle des artères. En revanche, l'innervation sympathique périvasculaire permet une vasoconstriction puissante et rapide.<sup>111</sup> L'étendue du plateau d'autorégulation cérébral peut varier en fonction du sujet et des circonstances physiopathologiques. On note que ce plateau est plus restreint chez les nouveau-nés que chez l'adulte. De même, les situations pathologiques influencent l'étendue du plateau: l'hypertension chronique de l'adulte tend à déplacer le plateau vers les pressions plus élevées, rendant le sujet plus fragile aux baisses tensionnelles avec les risques encourus d'ischémie cérébrale.<sup>127</sup> L'ischémie cérébrale perturbe l'ARC, comme les modifications métaboliques (pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>).<sup>128</sup> L'hypercapnie, l'acidose et l'hypoxie diminuent les RVC, augmentent le DSC et réduisent le plateau d'autorégulation cérébral. A l'inverse l'hypocapnie et l'alcalose augmentent les RVC ayant pour conséquence une réduction du DSC, et un élargissement du plateau d'autorégulation cérébral. Ces modifications aiguës ou chroniques sont réversibles.

L'ARC implique des mécanismes adaptatifs jouant sur le diamètre des vaisseaux. Néanmoins, il existe des limites maximales de diamètres des vaisseaux au delà desquels l'adaptation du DSC n'est plus possible: c'est la notion de réserve maximale de vasodilatation. Osol et coll. ont décrit la relation qui existe entre le diamètre du vaisseau, la tension pariétale et la pression transmurale (PTM).<sup>129</sup> Trois zones ont été identifiées: une première zone de PTM faibles (30 à 60 mmHg) pour lesquelles la vasodilatation est intense, et correspond à la partie inférieure du plateau d'ARC (vasodilatation adaptée). En dessous de 30 mmHg, la réserve de vasodilatation est déjà maximale, on peut alors observer une vasoconstriction paradoxale (hypoperfusion); une seconde zone de PTM moyennes (60 à 140 mmHg), le diamètre de l'artère est stable malgré un accroissement régulier de la tension pariétale (vasoconstriction protectrice); une zone de PTM au delà de >140 mmHg où la réserve maximale de vasoconstriction est déjà atteinte, le diamètre augmente proportionnellement à l'augmentation la tension pariétale (vasodilatation forcée=hyperhémie). Le réflexe myogénique est ici incapable de maintenir la stabilité du DSC. Le réflexe myogénique qui agit au niveau de la paroi vasculaire est probablement le principal mécanisme mis en jeu très rapidement dans les suites de variations brutales de la pression artérielle.<sup>130</sup> Le réflexe myogénique est responsable d'une vasodilatation ou d'une vasoconstriction en fonction du niveau bas ou élevé de la pression. Il protège la microcirculation cérébrale lors des pics hypertensifs.<sup>131, 132</sup> La voie d'activation du réflexe myogénique est complexe et mets en jeu exclusivement les cellules musculaires lisses. Des auteurs ont bien montrés que ce réflexe persistait même en cas d'absence d'endothélium vasculaire ou d'innervation périvasculaire.<sup>133</sup>

Néanmoins, l'endothélium et l'innervation périvasculaire sécrètent les médiateurs vasoactifs utiles à la modulation de l'intensité de la réponse myogénique.<sup>134</sup>

Les mécanismes impliqués dans la régulation du tonus basal et vasomoteur sont encore imparfaitement compris, en particulier l'ensemble des récepteurs membranaires activés<sup>135</sup>. Le stimulus initial semblerait être l'augmentation de la tension pariétale qui activerait des canaux ioniques  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  et des mécanorécepteurs membranaires. Ils permettraient la dépolarisation membranaire, puis l'ouverture des VDCC.<sup>136</sup> L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  provoque la formation de complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmoduline. Ce complexe active la phosphorylation des chaînes légères de myosine et la contraction des fibres musculaires lisses. A l'inverse, la diminution de la tension pariétale favorise l'activation de récepteurs couplés aux protéines G, dont les voies de signalisation (IP3, PKC, RhoA/Rho Kinase) aboutissent à une diminution du taux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire.<sup>136</sup> La réduction du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire provoque la déphosphorylation des chaînes légères de myosine et la relaxation des fibres musculaires lisses.<sup>137</sup>

L'exploration de l'ARC passe par la détermination des limites du plateau d'autorégulation. On différencie l'évaluation de l'ARC de manière statique et de manière dynamique. L'évaluation statique évalue les variations de DSC par rapport à la pression de perfusion cérébrale à un temps (t). Les méthodes statiques servent surtout, chez un même individu, au suivi à long terme de pathologies chroniques. L'évaluation dynamique évalue les variations rapides du DSC. Les méthodes dynamiques évaluent la réactivité et l'intégrité du système d'ARC au cours d'une situation aiguë. Ces techniques doivent pouvoir évaluer le DSC et la pression de perfusion en temps réelle.<sup>138, 139</sup>

#### 1.2.2.5 -- Vasoréactivité cérébrale au $\text{CO}_2$

Le  $\text{CO}_2$  influence le comportement du tonus vasculaire cérébral.<sup>140, 141</sup> La vasoréactivité au  $\text{CO}_2$  (VR $\text{CO}_2$ ) est la capacité du système vasculaire de mettre en place une réponse vasomotrice adaptée à la concentration intracérébrale en  $\text{CO}_2$ . En effet, l'hypercapnie possède de fortes propriétés vasodilatatrices artériolaires et veinulaires. Elle augmente le DSC et le volume sanguin cérébral. A l'inverse, l'hypocapnie induit une vasoconstriction cérébrale, une diminution du DSC et du volume sanguin cérébral.<sup>142, 143</sup> Le pH et le taux de  $\text{CO}_2$  intracérébral contrôlent la régulation du système cardio-ventilatoire.<sup>128, 144</sup> Le  $\text{CO}_2$  modifie le tonus vasculaire au niveau de la microcirculation cérébrale. Les grosses artères cérébrales sont peu sensibles au stimulus  $\text{CO}_2$ . Leur rôle est principalement de conduire le flux sanguin vers la microcirculation régionale. La partition du DSC total en DSC régionaux (DSCr) dépend donc de l'intensité du tonus vasomoteur local. Le  $\text{CO}_2$  est produit par le métabolisme aérobie, et « sert » de marqueur du métabolisme



cérébral. Physiologiquement, le CO<sub>2</sub> adapte le DSCr par rapport à la demande métabolique locale.<sup>145</sup> Chez l'adulte par exemple, le DSCr étant plus élevée au niveau cortical que dans la substance blanche, la VRCO<sub>2</sub> est également plus importante.<sup>146</sup> Dans un cerveau en développement les conditions sont encore différentes. Tester la VRCO<sub>2</sub> permet donc d'évaluer la réserve de vasodilatation de la circulation cérébrale.

Les mécanismes impliqués dans la VRCO<sub>2</sub> sont encore mal compris. L'effet passe probablement par l'activation de canaux membranaires de type K<sup>+</sup>-ATP-dépendant et K<sup>+</sup>- voltage-dépendant.<sup>147</sup> Comme nous l'avons vu pour la régulation du tonus vasomoteur, la sortie du K<sup>+</sup> des cellules musculaires lisses induit une hyperpolarisation membranaire<sup>113</sup> et consécutivement la réduction de l'entrée de Ca<sup>2+</sup> induit aussi une relaxation des cellules musculaires lisses. Chez l'homme, l'hypercapnie induit également une synthèse de NO par les cellules endothéliales<sup>148-150</sup> et la synthèse de prostaglandine E2.<sup>151</sup> La VRCO<sub>2</sub> est interdépendante des autres mécanismes régulateurs du DSC dont nous avons précédemment décrits, des conditions hémodynamiques et métaboliques (voire cette excellente revue : Ainslie PN, 2009<sup>128</sup>).

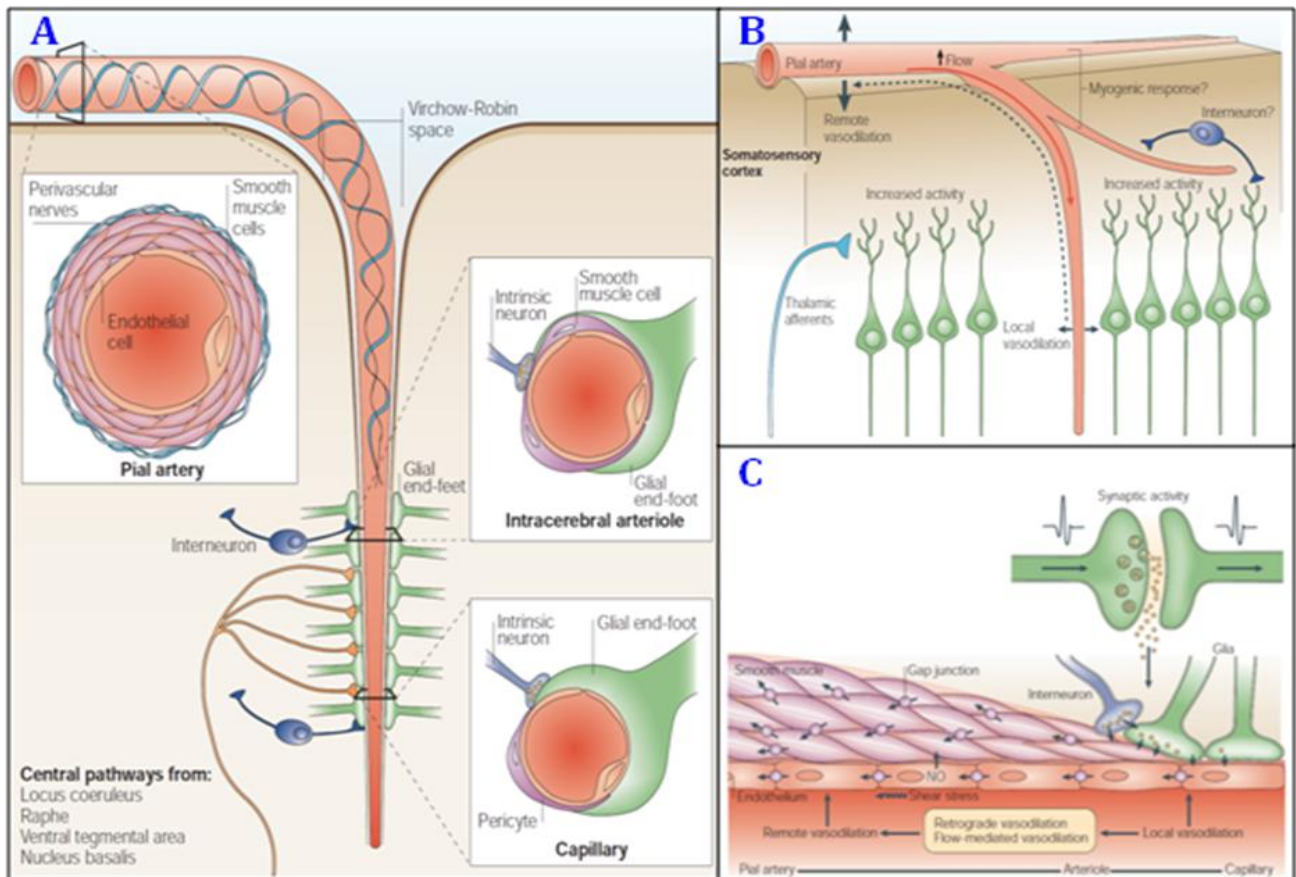
La vasoréactivité cérébrale au CO<sub>2</sub> au cours de l'ischémie a été étudiée dans des modèles animaux d'ischémie focale permanente<sup>152-155</sup> et d'ischémie globale transitoire.<sup>156-159</sup> Ces études retrouvent une absence de VRCO<sub>2</sub> au cours de l'ischémie. Dans une étude chez des babouins ayant subi une occlusion de l'ACM gauche, la VRCO<sub>2</sub> était abolie dans le cœur et dans la pénombre, et très fortement diminuée dans territoires adjacents.<sup>155</sup> Des résultats comparables ont été retrouvés chez le chien.<sup>160</sup> Les auteurs ont trouvé que la profondeur de l'ischémie était corrélée à la sévérité de la dysfonction de la VRCO<sub>2</sub>. En effet, lorsque l'ischémie était sévère (DSCr < 40% du DSC basal) et modérée (DSCr= 40 à 70% du DSC basal), la VRCO<sub>2</sub> était profondément altérée.<sup>160</sup> Ce phénomène perdurait au cours de la reperfusion. Pour les ischémies moins sévères (>70% du DSC basal) la VRCO<sub>2</sub> était conservée. Ceci mettait en évidence la relation existante entre l'altération de la capacité de vasoréactivité de l'endothélium au CO<sub>2</sub> et l'intensité de l'ischémie.

Une étude a exploré en IRM de diffusion la cinétique d'évolution de la VRCO<sub>2</sub> pendant l'ischémie et la reperfusion dans un modèle d'ischémie focale permanente et transitoire chez le rat.<sup>161</sup> L'absence complète de la vasoréactivité cérébrale au CO<sub>2</sub> apparaissait dès la période d'ischémie. Une autre étude dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire chez le rat a montré que la VRCO<sub>2</sub> ne se corrigeait à la reperfusion que pour les territoires les moins sévèrement atteints pendant l'ischémie (ADC>80).<sup>162</sup> Cependant, elle restait altérée pour les territoires sévèrement atteints (ADC< 80%) malgré une normalisation métabolique (ATP normal en séquence perfusion). Cette étude évoquait la possibilité qu'une IRM fonctionnelle couplée à une cartographie de la VRCO<sub>2</sub> pourrait différencier les lésions ayant un potentiel de récupération et les lésions fixées.<sup>163</sup> Chez l'homme, les évaluations en IRM de la VRCO<sub>2</sub> à distance d'un AVCi ont retrouvé des résultats comparables, avec une diminution de la capacité vasodilatatrice des artères cérébrales à l'hypercapnie dans la zone infarctée, mais une augmentation de la vasoconstriction à

l'hypocapnie<sup>164</sup>. Ces altérations des réserves vasomotrices vasodilatatrices et vasoconstrictrices persistent bien au delà de la phase précoce de la reperfusion, et influencent probablement la récupération et le pronostic neurologique.

Les études dans le cerveau immature sont peu nombreuses. En conditions physiologiques, la VRCO<sub>2</sub> est présente chez le jeune, comme l'ont montré Pryds et al. chez des rats P3-P5 jours.<sup>165</sup> Chez 10 rats, la perfusion cérébrale a été évaluée par monitoring Laser Doppler, et montrait une augmentation du DSC de 17% par rapport au niveau basal après inhalation d'un mélange à 8% CO<sub>2</sub>. L'ARC était également déjà mise en place à cet âge. Par ailleurs, la VRCO<sub>2</sub> semble continuer à « mûrir » au cours du développement postnatal. Chez le porcelet de 4 jours de vie, la capacité de vasodilatation à l'hypercapnie est réduite, puis quadruple à 1 mois de vie pour s'approcher des niveaux adultes.<sup>166</sup> Mais au cours de l'ischémie, les résultats semblent identiques à ceux observés chez les animaux adultes, avec une absence de réponse des artères cérébrales probablement par réduction de la synthèse des médiateurs vasodilatateurs comme les prostaglandines<sup>167</sup> et le NO.<sup>150, 168</sup> Les études chez l'enfant ont également testé cette vasoréactivité dans les situations de traumatismes crâniens et de neurochirurgie.<sup>169</sup> La relation entre le CO<sub>2</sub> et le DSC est une relation de type linéaire pour les valeurs CO<sub>2</sub> comprises entre 25 et 55 mmHg.<sup>170, 171</sup> Chez le nouveau-né prématuré, la VRCO<sub>2</sub> est présente dès 26 SA. Chez le nouveau-né à terme, la VRCO<sub>2</sub> augmente probablement du fait de l'architecture vasculaire et d'une paroi musculaire plus épaissie.<sup>172</sup> La mise en place de la VRCO<sub>2</sub> chez des nouveau-nés prématurés et à terme a été montrée par IRM cérébrale fonctionnelle.<sup>173</sup> Au décours de l'asphyxie périnatale, la VRCO<sub>2</sub> était altérée. Il n'y a pas de données dans l'AVCi de l'enfant.

En résumé, la restauration partielle de la VRCO<sub>2</sub> au cours de la reperfusion est un élément précoce du pronostic lésionnel, corrélé à la sévérité et à la durée d'ischémie.<sup>160, 161</sup> La VRCO<sub>2</sub> est un des mécanismes expliquant l'hyperhémie de reperfusion.



**Figure 6**

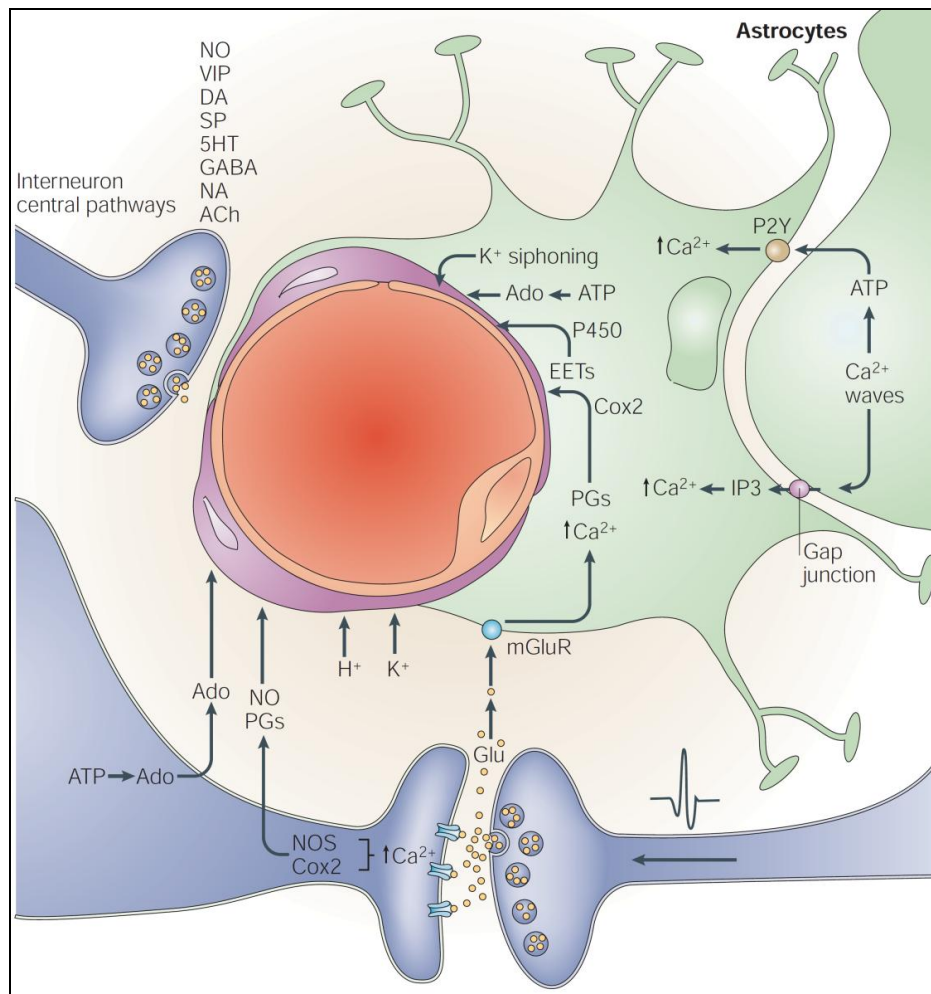
**Représentation de l'Unité Neurovasculaire (UNV) et des interactions cellulaires au niveau**

**de la microcirculation cérébrale** (Iadecola C, Nature Neuroscience Review 2004) **A-** Les neurones et les astrocytes sont fonctionnellement couplés aux cellules musculaires lisses et aux cellules endothéliales. L'interaction de ces cellules entre elles constitue une **unité fonctionnelle appelée unité neurovasculaire**. Les artères cérébrales sont composées d'une couche de cellules endothéliales, une couche de cellules musculaires et une couche externe de cellules leptoméningées, appelée adventice. Au niveau des espaces de Virchow-Robin, les artérioles pénètrent plus profondément dans le cerveau. Ensuite cet espace disparaît et la membrane basale des artérioles intracérébrales et des capillaires provient du contact direct avec les terminaisons ou « pieds » astrocytaires. Les cellules endothéliales cérébrales sont uniques en ce sens qu'elles ne sont pas fenêtrées et sont reliées entre elles par des adhérences localisées, connues sous le nom de « jonctions serrées ». Leurs caractéristiques morphologiques constituent la barrière hémato-encéphalique. Les cellules endothéliales synthétisent et sécrètent de puissants vasodilatateurs, tels que le NO et Prostacycline, ainsi que des vasoconstricteurs tels que l'endothéline. Les substances vasoactives sont libérées soit par des molécules agonistes ou antagonistes, soit par des changements dans les contraintes de cisaillement à la surface de l'endothélium. Les jonctions serrées permettent de transmettre les messages intracellulaires aux cellules adjacentes. Les cellules musculaires lisses et des péricytes convertissent les signaux

chimiques qui proviennent des cellules endothéliales, les neurones et les astrocytes, puis modifient en réponse le diamètre vasculaire. Ces modifications passent par des modifications de concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Le  $\text{Ca}^{2+}$  agit sur la phosphorylation de la chaîne légère myosine. Les cellules musculaires lisses répondent également aux changements de pression intravasculaires. Cette propriété permet aux cellules musculaires lisses de s'opposer à l'écoulement du sang par les mécanismes d'autorégulation cérébrale. Ainsi, les neurones, les astrocytes, l'innervation périvasculaire et les cellules vasculaires constituent une unité fonctionnelle dont l'objectif principal est de protéger le cerveau, de maintenir l'homéostasie du microenvironnement cérébral. L'unité neurovasculaire fournit également une première ligne de défense contre les effets délétères de l'ischémie cérébrale.

**B- Propagation locale de la réponse microcirculatoire à la stimulation du cortex sensorimoteur.** La stimulation des terminaisons nerveuses sur les microvaisseaux induit une vasodilatation locale qui se propage à distance et de manière rétrograde au flux sanguin vers les artères piales. Les artères piales augmentent alors le débit sanguin circulant vers les branches d'aval. Les ajustements du tonus myogénique permettent de limiter le débit sanguin vers les aires quiescentes.

**C- Mécanisme possible de vasodilatation rétrograde de la microcirculation cérébrale vers les artères piales.** Les cellules musculaires se relâchent suite à une libération de médiateurs vasodilatateurs des neurones et astrocytes. La relaxation rétrograde est transmise par les jonctions intercellulaires serrées, entre les cellules endothéliales. Lorsque le débit sanguin augmente en amont, les mécanismes de Shear-Stress entraînent la synthèse accrue de NO par les cellules endothéliales, qui permet de favoriser la vasodilatation rétrograde.



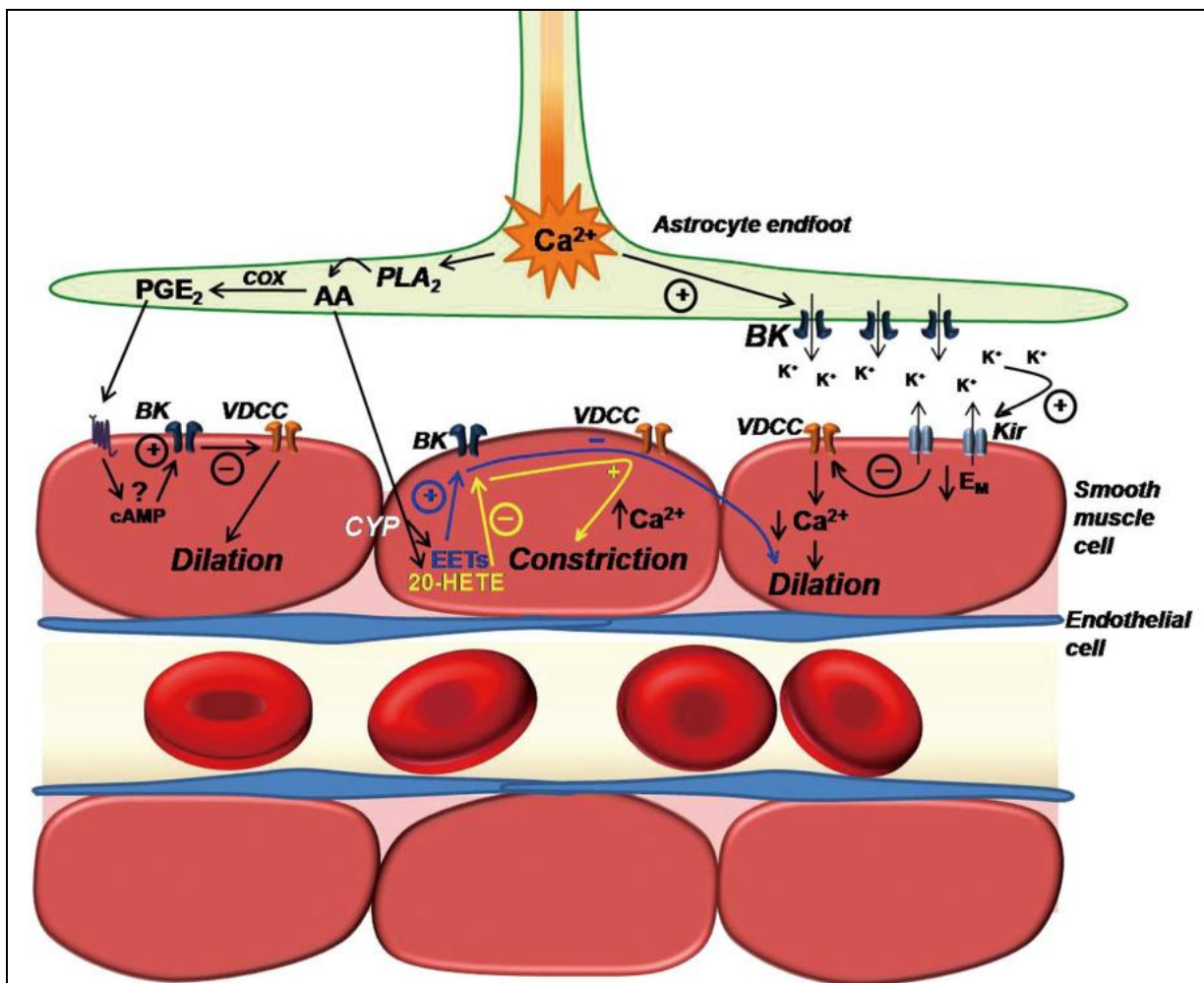
**Figure 7**

**Transmission de l'information synaptique et relations intercellulaires au niveau de l'UNV**

(Iadecola C, Nature Neurosciences Review 2004)

La libération du glutamate fait suite à la transmission synaptique. Le glutamate transmet l'information de dépolarisation au neurone postsynaptique. Le glutamate active des voies de signalisation au niveau des astrocytes par l'intermédiaire des récepteurs mGlu, induisant une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, puis la synthèse de NO par l'intermédiaire de la Cox2 et d'autres médiateurs vasoactifs comme l'EET. Les astrocytes transmettent entre eux l'information de dépolarisation par des vagues calciques, par l'intermédiaire des récepteurs purinergiques et des jonctions serrées. Les neurones postsynaptiques transmettent également l'information de dépolarisation par l'activation de la NOS et de l'adénosine, qui diffusent à travers la membrane vers les péricytes et les cellules musculaires lisses vasculaires. Les flux  $\text{H}^+$  et  $\text{K}^+$  sont également modifiés au cours de la dépolarisation postsynaptique et participent à la transmission du signal vers l'UNV. Les interneurones et l'innervation intrinsèque jouent un rôle modulateur des messages postsynaptiques et astrocytaires transmis aux cellules effectrices vasculaires, grâce à la libération

de nombreux neurotransmetteurs et neuropeptides vasoactifs tels que le NO, le vasoactive intestinal polypeptide (VIP), la dopamine (DA), la substance P (SP), la sérotonine (5HT), le GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique), la noradrénaline (NA) et l'acétylcholine (ACh). EETs= acide époxyeicosatriénoïque, Cox2 = cyclooxygénase-2, mGluR = récepteurs métabotropiques au glutamate, PG= prostaglandines, Ado=Adénosine, Glu= Glutamate, NO= monoxyde d'azote, P2Y= récepteurs purinergiques, cytochrome P450, IP3= Inositol (1,4,5)-triphosphate.



**Figure 8**  
**Rôle du K<sup>+</sup> dans les mécanismes de couplage neurovasculaire, effets sur la vasomotricité des cellules musculaires lisses vasculaires (Dunn KM, Circulation J 2010)**

Le Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> des astrocytes active les canaux K<sup>+</sup> membranaires BK et libère le dans l'espace glio-vasculaire. Le K<sup>+</sup> active les canaux membranaires Kir à la surface des cellules musculaires lisses, responsable d'une hyperpolarisation membranaire, puis d'une diminution de l'entrée de Ca<sup>2+</sup> par les canaux VDCC, et au final une relaxation des fibres musculaires. A l'inverse la production d'AA, est transformée dans les cellules musculaires lisses en EET et 20-HETE qui inhibent les canaux BK et induisent une vasoconstriction.

AA= acide arachidonique; PLA2= phospholipase A2, PGE2= prostaglandine E2, BK= canal potassique membranaire, VDCC= canal calcique voltage dépendant, CoX= cyclooxygénase, EETs= acide époxyeicosatriénoïque, CYP= cytochrome P450, Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>= calcium intracellulaire

### 1.2.3 -- L'ischémie cérébrale

#### 1.2.3.1 -- Dysfonctions macrocirculatoires

L'ischémie est la conséquence de l'absence du flux sanguin dans un vaisseau. Lorsque l'on parle de vaisseau cérébral, on considère une artère ou une veine. On peut donc définir des ischémies artérielles et des ischémies veineuses. Par la suite, nous ne parlerons que des ischémies artérielles, et ne développerons pas plus avant la physiopathologie spécifique des ischémies veineuses.

L'ischémie représente en réalité un continuum entre l'hypoperfusion (DSC diminué mais non nul) et l'abolition complète du flux (DSC=0). La sévérité de l'hypoperfusion est directement corrélée au pronostic neurologique et aux lésions cérébrales. Selon les artères cérébrales impliquées, les territoires cérébraux sont plus ou moins systématisés et étendus. Cette variabilité est influencée par les processus ayant aboutis à l'ischémie. Par exemple, une embolie artérielle donne une atteinte focale et systématisée d'un territoire vasculaire défini. A l'inverse, l'arrêt cardiocirculatoire est responsable d'une ischémie globale et diffuse. Il convient donc de bien définir une notion importante, celle du territoire théorique atteint ou « zone à risque ». La zone à risque est définie comme l'ensemble du tissu cérébral vascularisé totalement ou partiellement par une artère cérébrale donnée. La zone à risque peut bénéficier d'un réseau collatéral permettant une suppléance partielle ou totale. Ainsi, l'étendue de la zone à risque varie d'un individu à l'autre. L'IRM de diffusion permet de localiser la zone de souffrance de tissu cérébral dès la première heure.<sup>174, 175</sup> L'IRM de perfusion montre une zone hypoperfusée correspondant à la zone de risque. La zone centrale est appelée le « cœur » de l'infarctus, faiblement supplée par la collatéralité (zone d'ischémie profonde) avec une nécrose précoce, sans capacité de récupération. La zone de pénombre est une zone « grise », où le recrutement des collatérales est variable. L'étendue des lésions ischémiques dans la pénombre diffère en fonction de la profondeur et de la durée de l'hypoperfusion, ainsi que des capacités de recrutement des collatérales.<sup>51, 174-179</sup> La pénombre possède donc un potentiel de récupération. Elle est la cible des thérapeutiques neuroprotectrices. Ces notions sont importantes car elles peuvent expliquer la variabilité de la taille de l'infarctus malgré des conditions expérimentales ou cliniques identiques.

Comme nous le développerons plus loin, la reperfusion est une étape fondamentale concernant le pronostic neurologique quelque soit les mécanismes à l'origine de l'ischémie. La reperfusion est intimement reliée à la période d'ischémie. La reperfusion comprend sur le plan circulatoire, deux étapes successives : une phase hyperhémique précoce dite de « reperfusion de luxe », et une phase secondaire d'hypoperfusion. Ces deux phases ont des mécanismes physiopathologiques bien distincts et des conséquences également distinctes sur le tissu cérébral.



La phase d'hyperhémie débute dans les minutes qui suivent le début de la reperfusion et est brève, souvent moins d'une heure. L'hyperhémie est la conséquence d'une vasodilatation artérielle intense.<sup>180</sup> Cette vasodilatation artérielle s'explique par l'hypoperfusion, la chute du taux d'oxygène et du glucose tissulaires pendant l'ischémie.<sup>181</sup> La diminution des RVC diminue considérablement dans le but d'augmenter ainsi le DSCr. L'intensité de cette vasodilatation est directement liée à la profondeur de l'hypoperfusion dans la zone à risque, et par voie de conséquence à la qualité du recrutement des collatérales artérielles.

L'hyperhémie a été largement mise en évidence dans les modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale de l'adulte.<sup>182-187</sup> Cependant, en ce qui concerne le cerveau immature, certaines données récentes semblent en contradiction avec les mécanismes physiopathologiques décrits chez l'adulte. En effet, dans un modèle d'ischémie anténatale de l'artère utérine chez la rate, les auteurs ont montré que la reperfusion avait un profil différent, avec une ascension lente et progressive du DSC sans hyperhémie.<sup>188</sup> Ces résultats sont concordants avec d'autres résultats obtenus dans un modèle d'occlusion anténatale transitoire de l'artère brachiocéphalique chez des fœtus d'agneau. Dans cette étude, le DSC n'était pas significativement différent à 5, 30 et 60 min de reperfusion par rapport au niveau basal, mettant en évidence une reperfusion non brutale.<sup>189</sup> Mais finalement peu de données supplémentaires sont venues s'ajouter à ces études, sans pouvoir apporter d'explications convaincantes sur les mécanismes physiopathologiques impliqués. Par ailleurs, aucune donnée dans un modèle d'AVCi néonatale n'a pu être comparée aux données adultes.

La seconde phase est caractérisée par une hypoperfusion cérébrale retardée. Elle débute entre 30 min et 1 h après la reperfusion, et se prolonge souvent plusieurs heures. La physiopathologie de cette phase est encore moins bien éclaircie. Elle semble probablement en rapport avec la défaillance énergétique secondaire qui apparaît entre 4 h et 6 h de reperfusion. En fait, la réduction du DSC est une conséquence de l'augmentation des résistances vasculaires cérébrales (RVC). Les mécanismes responsables de l'augmentation des RVC sont multifactoriels : œdème cytotoxique post-ischémique, vasospasmes au niveau de la microcirculation artérielle mis en évidence par microscopie électronique chez le rat<sup>190</sup>, réduction des médiateurs vasodilatateurs comme le NO<sup>191, 192</sup> ou encore de manière adaptée à une réduction des besoins métaboliques cellulaires.<sup>193</sup> Tous ces mécanismes peuvent participer à cette hypoperfusion, sans pouvoir bien préciser l'implication et le délai de chacun dans les processus ischémiques.

L'ischémie est responsable d'une dysrégulation des capacités de vasoréactivité et de l'ARC. Les études expérimentales ont mis en évidence que cette dysrégulation de l'ARC était décrite lors d'épisodes d'ischémies transitoires<sup>194</sup> ou permanentes.<sup>154</sup> Dans un modèle d'occlusion permanente de l'ACM chez le rat, l'intensité de la dysrégulation de l'ARC était liée à l'importance de la réduction du DSC au cours de l'ischémie.<sup>154</sup> La relation DSC et pression artérielle moyenne devient linéaire.<sup>195</sup> La dysrégulation de l'ARC se traduit par des modifications des limites supérieures et inférieures du plateau d'autorégulation. La diminution de la limite supérieure

protège moins le cerveau contre les poussées hypertensives, souvent présentes à la phase aigüe de la reperfusion d'un AVCi.<sup>152</sup> La limite inférieure est davantage déplacée vers les pressions artérielles plus élevées et protège moins le cerveau des chutes tensionnelles, en particulier lors de la phase d'hypoperfusion secondaire.<sup>195</sup> Selon les modèles expérimentaux, ces dysrégulations peuvent apparaître précocement<sup>196</sup> et se prolonger plusieurs jours à la reperfusion.<sup>159</sup> Les études cliniques ont confirmés ces mêmes résultats dans l'AVCi de l'adulte.<sup>195, 197</sup> Par contre, peu de données émergent à propos de l'évaluation de l'ARC dans l'AVCi néonatale. Ces résultats ouvrent la voie à de futurs travaux de recherche, cliniques et fondamentaux, à propos de l'ARC au cours de l'ischémie et à la reperfusion dans un cerveau immature.

#### 1.2.3.2 -- Dysfonctions microcirculatoires

La microcirculation cérébrale est l'élément clé de l'UNV. Comme nous l'avons vu précédemment, la microcirculation cérébrale est unique au sein de l'organisme, régulée avec précision en fonction des situations physiologiques. L'endothélium vasculaire est une interface entre le système sanguin et le tissu cérébrale.<sup>115</sup> La paroi des microvaisseaux sert de « filtre métabolique » : contrôle et maîtrise des entrées vers les cellules cérébrales. Au cours de l'ischémie, les troubles macrocirculatoires retentissent sur la microcirculation, l'UNV et la BHE. Ces dysfonctionnements structurels et fonctionnels ont pour conséquence in fine l'agression des cellules cérébrales.

##### 1.2.3.2.1 Barrière hémato-encéphalique

La BHE peut être structurellement dissociée en deux unités fonctionnelles adjacentes: la paroi endovasculaire constituée des cellules endothéliales, et la matrice extracellulaire (MEC) reliant le mur vasculaire aux prolongements astrocytaires.<sup>193</sup> La BHE dite primaire est constituée d'un système de jonctions intercellulaires appelées jonctions serrées, interconnectant les cellules endothéliales.<sup>198</sup> Les jonctions serrées sont composées de protéines transmembranaires appelées claudines et occludines.<sup>199, 200</sup> Elles limitent les communications paracellulaires, favorisent la polarisation des cellules endothéliales, le transport sélectif dans le sens apical-basal, et permettent également le contrôle des flux transendothéliaux.<sup>201</sup> La BHE dite secondaire est constituée de la membrane basale vasculaire, des molécules adhésion et des prolongements astrocytaires périvasculaires. La membrane basale est une émanation de la MEC. Elle maintient la stabilité de la paroi vasculaire et joue un rôle considérable dans les communications entre cellules endothéliales et les astrocytes.<sup>202</sup> La membrane basale est constituée de protéines constituant habituellement la MEC, tels que la laminine, le collagène de type IV, la fibronectine et diverses

protéoglycanes. Ces protéines sont synthétisées à la fois par les astrocytes et par les cellules endothéliales. La laminine est le principal constituant non collagénique de la membrane basale. Elle joue un rôle de soutien du mur vasculaire et contribue à l'effet résistif de l'endothélium vis à vis du flux sanguin.<sup>203</sup> La laminine permet l'interconnection des cellules endothéliales avec les prolongements astrocytaires. Le collagène est davantage impliqué dans la résistance de la MEC.

La BHE est impliquée dans la régulation de l'entrée des nutriments, de protéines et la sortie des produits de dégradation du métabolisme. Elle régule les mouvements ioniques et hydriques entre le sang et le LCR. La BHE protège ainsi le cerveau des fluctuations ioniques aiguës.<sup>204</sup> Ces mécanismes sont consommateurs d'énergie et mettent en jeu des transporteurs spécifiques. Ils peuvent également impliquer les mécanismes d'endocytose au niveau des membranes basale et apicale de l'endothélium. Del Zoppo et al. ont décrit la microcirculation cérébrale comme étant le point de départ des processus ischémiques, et en particulier par l'altération de la perméabilité de la BHE, l'activation de la coagulation intravasculaire, et par les conséquences de l'absence de reperfusion. Il définit ainsi une triade appelée Triade de Virchow, mettant l'accent sur les dysfonctions initiales au niveau de la microcirculation.<sup>205</sup>

#### 1.2.3.2.2 Endothélium vasculaire

Malgré une résistance relative à l'ischémie<sup>206</sup>, l'endothélium vasculaire subit l'hypoxémie et la carence métabolique. L'ischémie est responsable d'une perte d'intégrité de la paroi vasculaire, et par voie de conséquence de la BHE.<sup>76</sup> La BHE devient alors perméable et ne joue plus son rôle de contrôle des flux vers les cellules cérébrales. Les cellules inflammatoires sanguines, les cytokines et diverses protéases traversent la paroi vasculaire. Ainsi, les altérations structurelles et fonctionnelles de l'endothélium vasculaire sont le point de départ de plusieurs mécanismes lésionnels sur le tissu cérébral. La rupture de l'endothélium est due à la perte d'intégrité des jonctions serrées<sup>207</sup> et également à celle de la membrane basale. En conditions normoxiques, cet endothélium exprime peu de récepteurs d'adhésions aux polynucléaires neutrophiles. Au cours de l'ischémie ces récepteurs d'adhésions, de type sélectine (E-sélectine et P-sélectine) ou ICAM, se trouvent fortement exprimés à la surface endothéliale.<sup>208, 209</sup> Ils vont ainsi permettre l'adhérence des PNN à la paroi vasculaire, puis l'infiltration du tissu cérébral.<sup>210</sup> Les propriétés antithrombotiques de l'endothélium passent par l'expression de protéines de surface comme le glycocalix qui limite l'activation de protéines sanguines de la coagulation. Bien entendu, l'endothélium sécrète des molécules vasodilatatrices et antiagrégantes comme l'adénosine et les prostaglandines.<sup>211</sup>

#### 1.2.3.2.3 Membrane basale

Structurellement, la dissolution de la membrane basale survient précocement après le début de l'ischémie et se poursuit à la reperfusion.<sup>212</sup> Les protéines de la membrane basale, comme la laminine, le collagène, la fibronectine sont rapidement dégradées par des enzymes métalloprotéasiques.<sup>213</sup> Dès la deuxième heure, il se produit une diffusion d'enzymes protéolytiques d'origine plasmatique.<sup>208</sup> Les capacités anti-protéasiques locales sont rapidement dépassées. Les enzymes protéolytiques (plasminogène, métalloprotéases, cathepsines) dégradent les protéines de la membrane basale. La membrane basale perd également ses protéines d'adhésion aux cellules endothéliales et aux astrocytes, dont les principales sont appelées intégrines.<sup>214, 215</sup> Les intégrines jouent un rôle fondamental dans la stabilité de la MEC, et la réduction de l'expression des intégrines est un phénomène précoce.<sup>216</sup> La perte des connections et communications entre l'endothélium et les astrocytes est un mécanisme lésionnel cérébral important.<sup>198, 217</sup> La perte d'intégrité de la BHE est responsable d'une augmentation de la perméabilité membranaire, laissant fuir l'eau et les ions favorables à l'œdème intracellulaire. Elle permet aussi le passage des leucocytes et des cytokines provoquant la destruction de la MEC. Par ailleurs, l'inflammation périvasculaire qui apparaît est délétère pour les astrocytes et les neurones, et conduit à l'activation de l'apoptose. La perméabilité de la membrane basale peut induire également des hémorragies, aggravant davantage l'hypoxie tissulaire.

Au final, la perte d'intégrité de la paroi vasculaire est un mécanisme précoce au cours de l'ischémie cérébrale<sup>218</sup> et impliqué dans la mise en jeu de nombreux mécanismes responsables de lésions tissulaires secondaires.

#### 1.2.3.2.4 Reperfusion de la microcirculation

Comme nous l'avons vu précédemment, l'altération des fonctions endothéliales et la dissolution de la membrane basale sont à l'origine des dysfonctions microcirculatoires observées au décours de l'ischémie. La reperfusion de la macrocirculation ne s'associe pas obligatoirement à une reperfusion de la microcirculation, qui peut alors être incomplète ou absente en fonction des territoires. L'absence de reperfusion s'explique par la mise en jeu de plusieurs mécanismes de manière conjointe: l'altération de la paroi vasculaire, l'activation de la coagulation, l'activation des mécanismes inflammatoires. La perte de l'intégrité de la paroi vasculaire induit aussi l'activation des plaquettes et du fibrinogène responsable localement de phénomènes microthrombotiques artériolaires et capillaires. En effet, la perméabilité vasculaire permet la mise en contact du facteur tissulaire pro-coagulant et des protéines plasmatiques de la coagulation. Les plaquettes activées

et la fibrine activent la cascade de la coagulation, la formation de la thrombine responsable de l'obstruction des microvaisseaux.<sup>208, 219</sup>

Les cellules de l'inflammation sont impliquées dans les mécanismes de non reperfusion par l'intermédiaire des PNN. Les PNN se fixent sur des récepteurs spécifiques d'adhésion membranaires situés sur l'endothélium vasculaire. Il existe une surexpression de ces récepteurs au cours de l'ischémie. Les PNN adhérents aux parois vasculaires freinent le flux sanguin et participent à la non reperfusion.<sup>220</sup>

Enfin, d'autres mécanismes peuvent être impliqués dans les phénomènes de non-reperfusion de la microcirculation, comme le développement d'un œdème tissulaire augmentant la pression extrinsèque autour des microvaisseaux.

#### 1.2.4 -- La reperfusion

La phase de reperfusion peut survenir de manière passive (endogène par activation des mécanismes de fibrinolyse) ou de manière active (par thrombolyse médicamenteuse ou par angioplastie). La reperfusion est un élément majeur du pronostic neurologique fonctionnel.<sup>221, 222</sup> Nous avons vu que la reperfusion comprenait une phase précoce hyperhémique, puis d'une phase d'hypoperfusion secondaire.<sup>195</sup> Nous allons décrire plus précisément les mécanismes physiologiques et cellulaires survenant durant cette reperfusion, et les conséquences sur le tissu cérébral.

##### 1.2.4.1 -- Lésions induites par la reperfusion

La reperfusion dans le territoire ischémié va permettre en premier lieu la réoxygénation tissulaire, puis la reprise du métabolisme énergétique aérobie par la reprise de la phosphorylation oxydative, et enfin permettre l'épuration des déchets cellulaires accumulés. Par ces aspects, elle permet la diminution de l'extension de la nécrose ainsi que la préservation de cellules survivantes dans la zone de pénombre.<sup>223</sup> Néanmoins, la reperfusion est à « double tranchant » puisqu'elle induit également la mise en jeu de processus délétères à l'origine de lésions dites induites par la reperfusion (« reperfusion injuries »).<sup>224, 225</sup> Pour des raisons de simplification, nous utiliserons par la suite l'abréviation RI du terme anglais de « reperfusion injuries ».

Les RI peuvent atteindre les neurones, le tissu de soutien microglial, les cellules inflammatoires (neutrophiles/macrophages) ou l'UNV.<sup>218</sup> Les études réalisées dans l'ischémie myocardique ont permis des avancées importantes dans la caractérisation et la compréhension des mécanismes.<sup>226, 227</sup> Le stress oxydatif est un élément déterminant des RI. La réoxygénation induit la production des radicaux libres oxygénés (ROS), et la production de radicaux libres nitrosilés (RNS) par le NO.<sup>228</sup> L'effondrement des défenses antioxydantes (superoxydes dismutase, catalases, glutathion peroxydase) est responsable de l'oxydation et de la nitrosylation des protéines, des lipides membranaires et de l'ADN.<sup>229</sup> Les mécanismes de RI sont également liés aux conséquences du métabolisme anaérobie comme l'acidocytie d'origine lactique. En réalité, cette acidocytie (acidose cellulaire) permet l'activation de processus de survie pendant l'ischémie.<sup>230</sup> La reperfusion favorise l'épuration des ions  $H^+$  et la normalisation du pH, d'autant plus rapidement que le DSC est élevé. Hors, la vitesse de normalisation du pH est un élément important dans l'activation des mécanismes de RI.<sup>231</sup> En effet, la modification rapide de l'équilibre acido-basique altère les équilibres ioniques de la cellule, en particulier celui du  $Ca^{2+}$ . L'épuration des ions  $H^+$  vers le milieu extracellulaire est sous la dépendance de la pompe  $Na^+/H^+$ . Les ions  $H^+$  vont sortir de la cellule en échange d'ions  $Na^+$ . L'entrée massive de  $Na^+$  va tenter d'être rapidement jugulée par la pompe  $Na^+/Ca^{2+}$  du réticulum endoplasmique (RE) là aussi par une

échange contre une sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  vers le cytosol. La libération importante dans le cytosol de  $\text{Ca}^{2+}$  aboutit à la phosphorylation de nombreuses protéines cytosoliques, et modifie en particulier l'équilibre des voies de signalisation de survie (RISK, SAFE, PKB) et d'apoptose.<sup>232</sup> Par ailleurs, le  $\text{Ca}^{2+}$  agit aussi sur le métabolisme mitochondrial en facilitant l'ouverture du pore de transition membranaire (mPTP) puis la libération de protéines pro-apoptotiques (cytochrome c, AIF).<sup>233</sup> La mitochondrie semble être une cible terminale des processus de RI.<sup>234</sup>

#### 1.2.4.2 -- Stress oxydatif

Le stress oxydatif est secondaire à la production de radicaux libres (ROS ou RNS). La reperfusion génère une production excessive de ces radicaux libres, liée à l'arrivée rapide d'oxygène à la reperfusion dans le territoire ischémié et aussi du fait de la production endogène de NO. Les ROS comprennent essentiellement l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), et le radical hydroxyl ( $\text{OH}^\cdot$ ). Les ROS sont essentiellement produit par la chaîne respiratoire de la mitochondrie. A l'état basal, l' $\text{O}_2^-$  représente 2 à 5% du flux d'électron de la chaîne respiratoire.<sup>235</sup> L' $\text{O}_2^-$  est produit à partir de l' $\text{O}_2$  par la NADPH oxydases (NOX). A partir de l' $\text{O}_2^-$  seront synthétisés les autres ROS. Les RNS sont des éléments dérivés de NO. Le NO est synthétisé par l'organisme à partir de la L-arginine grâce à la NOS (eNOS, nNOS, iNOS). Le NO est vasodilatateur, anti-inflammatoire et à la fois anti- et pro-apoptotique. Médiateur de voies de signalisation de survie (RISK, SAFE), il interagit avec le pore mPTP. Les eNOS et nNOS possèdent une activité plutôt neuroprotectrice au cours de l'ischémie-reperfusion, alors que la iNOS induirait davantage d'effets délétères.<sup>236</sup> Le NO interagit avec l' $\text{O}_2^-$  pour former le péroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ), principal RNS ayant aussi une forte cytotoxicité. Les RNS dérivés de l'oxydation et la réduction de l' $\text{O}_2$  et des ROS sont de dioxyde nitrogéné ( $\text{NO}_2^-$ ), le nitrosyl ( $\text{HNO}$ ), trioxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ).

L'état d'équilibre en les ROS et les RNS dans la cellule est un élément fondamental de l'homéostasie. Les cellules possèdent des défenses enzymatiques anti-oxydantes, les principales étant la superoxyde dismutase (SOD), les catalases, le glutathion peroxydase. D'autres petites molécules comme la vitamine E et A possèdent une activité antioxydante. La SOD possèdent 3 formes : SOD1 (CuZn-SOD, origine cytosolique), SOD2 (Mg-SOD, origine mitochondrial) et SOD3 (origine extracellulaire). La SOD détoxifie par l'oxydation de l' $\text{O}_2^-$  en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), puis en  $\text{H}_2\text{O}$  par les catalase et la glutathion peroxydase. Lorsque les défenses antioxydantes sont saturées, l'accumulation d' $\text{O}_2^-$  produit avec le NO des ions  $\text{ONOO}^-$  et avec l' $\text{H}_2\text{O}_2$  des ions  $\text{OH}^\cdot$ , tous deux hautement toxiques.

Au cours de l'ischémie-reperfusion, l'implication du stress oxydatif dans les modèles animaux adultes et du jeune a largement été démontré.<sup>228, 235, 237, 238</sup> L'ischémie-reperfusion génère

une production excessive de ces radicaux libres. Les ROS et les RNS sont responsables de l'oxydation et la nitrosilation des protéines et des lipides, responsable de dommages cellulaires à la reperfusion. La production excessive de ROS aboutit à une consommation des défenses antioxydantes. La production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> est massivement augmentée au cours des premières heures de la reperfusion.<sup>239</sup> La structure et le fonctionnement de l'UNV est compromise (neurones/microglie/BHE). L'O<sub>2</sub><sup>-</sup> fortement retrouvée dans les cellules endothéliales suggère son rôle central dans la constitution des lésions vasculaires.<sup>240</sup> L'altération de la BHE est responsable d'un œdème lésionnel et d'hémorragies cérébrales secondaires. La mitochondrie est le principal site de production des ROS dans la cellule mais également une cible spécifique des ROS (pore mPTP), aboutissant in fine à l'activation des voies exécutrices de l'apoptose (caspases dépendantes).

Les ROS ont une action directe sur trois principales protéines intracellulaires: NF-κB, p38, PI3-K. Le facteur de transcription nucléaire-κB (NF-κB) permet la transcription de gènes. Les radicaux libres permettent la phosphorylation de NF-κB, et ainsi sa translocation dans le noyau et des interactions avec des séquences promotrices. NF-κB augmente la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-6, IL1-β), l'activité de la iNOS, et in fine induit des altérations de la BHE et des lésions neuronales.<sup>241</sup> La p38 est une mitogen-activated protéine kinase (MAPK) influençant autant les facteurs de transcription que les protéines cytosoliques inflammatoires et apoptotiques. La phosphorylation de p38 induit des effets pro-apoptotiques et pro-inflammatoires délétères par l'intermédiaire de la phospholipase A2 (PLA2).<sup>242</sup> Enfin, la PI3-K active la phosphorylation de la protéine kinase Akt. A la différence de p38 et NF-κB, phospho-Akt active des voies de survie cellulaire comme la voie RISK. Akt inhibe certaines molécules pro-apoptotiques (Bad, Cytochrome c, Procaspase-9).<sup>243</sup> Le stress oxydatif possède donc une action inhibitrice sur PI3K/Akt, et favorise ainsi les processus de mort cellulaire.

Au final, le stress oxydatif est directement lié à la production excessive de ROS et RNS à la reperfusion, et aux capacités saturées des mécanismes de défenses anti-oxydantes. Les ROS agissent au niveau de protéines cellulaires en influençant l'activation de protéines apoptotiques et inflammatoires. De plus, les ROS altèrent directement la structure des protéines, de l'ADN et des lipides membranaires. Au bout du compte, le résultat est la destruction du tissu cérébral lésé et une augmentation des lésions cérébrales.



#### 1.2.4.3 -- Influence du pH intracellulaire

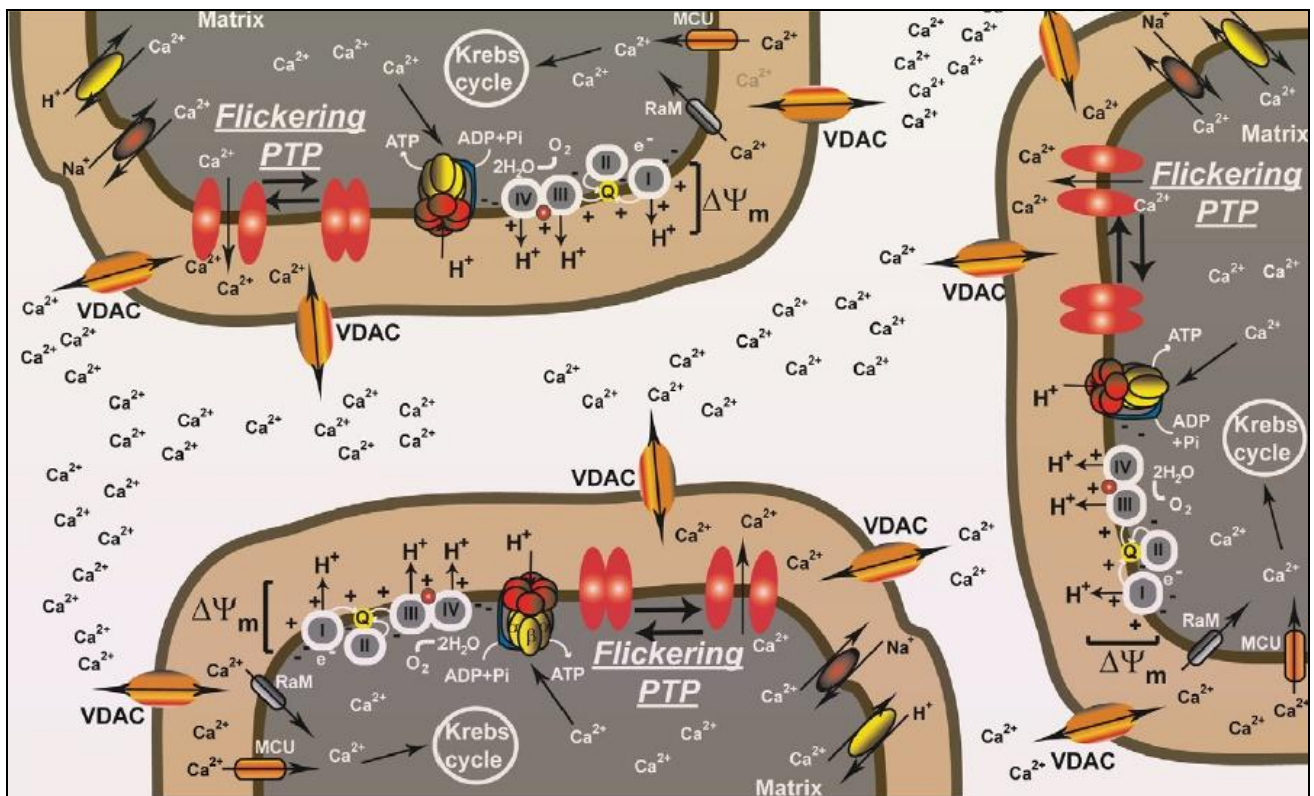
Le pH intracellulaire est régulé par des systèmes complexes de canaux ioniques membranaires. Ces canaux permettent d'équilibrer les mouvements ioniques de part et d'autre de la membrane cellulaire, de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique (RE). L'homéostasie cellulaire nécessite le contrôle des gradients électrochimiques entre le milieu intracellulaire et extracellulaire, entre la mitochondrie et le cytosol, entre le RE et le cytosol. Par ailleurs, l'homéostasie doit conserver l'électroneutralité dans la cellule. Lorsque la production  $H^+$  augmente, la cellule en élimine une partie grâce aux canaux ioniques membranaires. Les  $H^+$  sont expulsés à l'extérieur de la cellule, en échange de  $Na^+$  ou de  $Ca^{2+}$  (Figure 9 et 10).<sup>230</sup> Les principaux canaux ioniques responsables d'une élimination extracellulaire de la charge acide sont l'échangeur  $Na^+/H^+$  (NHE) ainsi que les co-transporteurs  $HCO_3^-/Na^+$  (NBC) et Lactates/ $H^+$  (MCT). L'échangeur NHE permet rapidement l'épuration vers le milieu extracellulaire des ions  $H^+$ , et le co-transport NBC permet l'entrée de bicarbonate vers le milieu intracellulaire pour tamponner la charge acide.<sup>244</sup> La mise en jeu de l'échangeur NHE et NBC entraînent une augmentation de la concentration intracellulaire de  $Na^+$ .<sup>245</sup> Le MCT élimine le lactate et d'ions  $H^+$ , dans les situations où l'acidose est principalement d'origine lactique. Parmi les autres systèmes tampons rapidement employés en cas d'acidocytie: le système bicarbonate/anhydrase carbonique et les systèmes protéiques. Le premier permet la formation de  $CO_2$  grâce à l'association  $HCO_3^-$  et  $H^+$ . Le  $CO_2$  est ensuite éliminé vers le milieu extracellulaire et épuré au niveau pulmonaire. Les anions  $HCO_3^-$  retournent ensuite vers le milieu intracellulaire pour restaurer l'efficacité du système tampon. Enfin, concernant les systèmes tampon des protéines, ils ont la capacité de chélater les ions  $H^+$  en particulier grâce à l'histidine. La modification du potentiel transmembranaire de la cellule induit alors une série de perturbations des échanges ioniques. Le RE et la mitochondrie sont particulièrement impliqués dans ces échanges. Afin de maintenir le potentiel de membrane, la pompe  $Na^+/K^+/ATPase$  membranaire est sollicitée pour permettre la sortie du  $Na^+$  vers le milieu extracellulaire, en échange d'une augmentation du  $K^+$  intracellulaire.

L'ischémie est responsable d'une acidocytie par l'excès de production d'ions  $H^+$  par la glycolyse anaérobie et la diminution de leur clairance. La reperfusion favorise l'épuration des ions  $H^+$ , la restauration des systèmes tampons, et de fait la normalisation du pH intracellulaire.<sup>231</sup> La vitesse de normalisation du pH est un élément fondamental dans la constitution des lésions de la reperfusion.<sup>233, 242</sup> A l'inverse, un retard à sa normalisation est un mécanisme impliqué dans l'effet neuroprotecteur du postconditionnement ischémique. Au cours de l'ischémie, le déficit énergétique de la cellule empêche le fonctionnement de cette pompe de manière optimale. La

régulation du  $\text{Na}^+$  intracellulaire va impliquer principalement l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCE) situé à la membrane cellulaire.<sup>245</sup> Son rôle habituel est de réguler la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Néanmoins, dans certaines circonstances il peut fonctionner en mode inversé. Au cours de la reperfusion, il permet ainsi d'éliminer le  $\text{Na}^+$  vers le milieu extracellulaire en échange d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Néanmoins ceci aboutit à une augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire.<sup>246</sup> Finalement, suite à une acidose générée par la glycolyse anaérobie et par l'absence de possibilités d'élimination de cette charge acide  $\text{H}^+$  dans la circulation sanguine, l'ischémie est responsable d'une altération importante de l'homéostasie cellulaire. Au niveau de la mitochondrie, le pH bas permet de limiter l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie et favorise la survie cellulaire.<sup>247</sup> Comme le  $\text{Ca}^{2+}$  joue un rôle dans la conformation du pore mPTP, son ouverture est une conséquence délétère de la reperfusion (Figure 9 et 10).<sup>247</sup> La libération dans le cytosol de cytochrome c et d'autres médiateurs pro-apoptotiques conduisent à la mort de la cellule par apoptose.

Le pH influence également l'activité enzymatique cellulaire. Les calpaines sont des protéases impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires majeures, comme la survie, l'apoptose, la prolifération, la migration. L'ischémie active la phosphorylation des calpaines. Au cours de la reperfusion, les calpaines sont activés par les rapides variations du pH.<sup>248</sup> Elles permettent l'hydrolyse de protéines structurales ( $\alpha$ -fodrine, ankyrine), aboutissant à une fragilité du cytosquelette, des membranes, et au final la formation d'un œdème cytotoxique délétère.

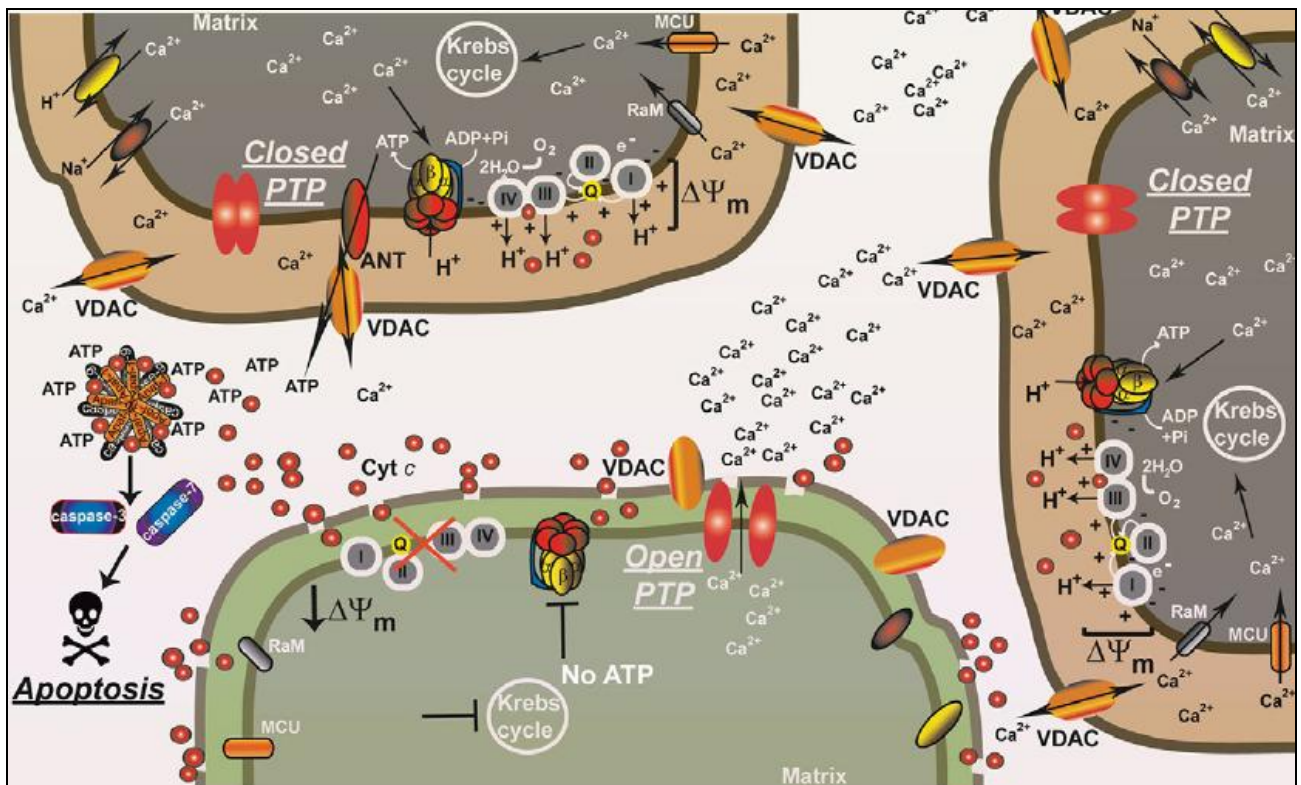
Le postconditionnement ischémique, par ses cycles successifs d'ischémie et de reperfusion, agit sur la reperfusion tissulaire et retarde la normalisation du pH au cours des premières minutes de revascularisation. Ce retard à la normalisation du pH<sub>i</sub> est un facteur déterminant de la réduction des lésions secondaires<sup>249, 250</sup> inhibition de l'activation des calpaines, réduction de la surcharge calcique, inhibition de l'ouverture du pore mPTP et de l'apoptose.



**Figure 9**

**Interactions Calcium, pore mPTP et chaîne respiratoire ( Rasola A, Cell Calcium 2011)**

La mitochondrie est un régulateur du métabolisme  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule. Elle équilibre la concentration  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique à travers la membrane externe grâce au pore VDAC, puis par d'autres pores de la membrane interne. L'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  utilise un échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Le pore mPTP n'est pas formé en condition normales, mais s'ouvre au cours des processus apoptotiques. Son ouverture est irréversible et libère tous le  $\text{Ca}^{2+}$  intramitochondrial dans le cytosol. Ceci va induire l'activation de l'apoptose. Lorsque la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial est trop élevée, l'ouverture du pore mPTP est alors facilitée. Le fonctionnement de la chaîne respiratoire est lié à la présence d'un gradient  $\text{H}^+$  transmembranaire. Les déséquilibres du métabolisme  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial altèrent l'équilibre électrochimique et le gradient  $\text{H}^+$  pouvant aboutir à une altération de la respiration mitochondriale.



**Figure 10**

**Le pore mPTP au cours de l'ischémie (Rasola A, Cell Calcium 2011)** L'ouverture du pore mPTP se forme principalement par l'association des protéines VDAC et ANT. Le pore induit une libération massive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol. Cette libération s'ensuit d'une altération des membranes mitochondriales, puis d'une fuite vers le cytoplasme de protéines ayant une action pro-apoptotiques (Cytochrome c, AIF) situées dans l'espace intermembranaire. La perméabilité mitochondriale s'accompagne d'une altération des gradients électrochimiques et de dysfonctionnements de la chaîne respiratoire. Les protéines pro-apoptotiques, et l'ATP libérée permet la formation d'un complexe pro-apoptotiques. Le complexe est appelé apoptosome et induit une cascade apoptotique dans le cytosol.  $\Delta\psi_m$ =force motrice protonique ou gradient de  $\text{H}^+$

### 1.2.5 -- La mitochondrie au cours de l'ischémie cérébrale

Au cours des processus ischémiques, la mitochondrie a une place déterminante dans le stress oxydatif par la production des radicaux libres et l'induction du métabolisme anaérobie. L'ouverture du pore mPTP joue un rôle particulièrement important dans l'amplification des mécanismes apoptotiques, et dans l'induction des RI.<sup>251, 252</sup> Nous analyserons les principales modifications des fonctions mitochondriales au cours de l'ischémie cérébrale et pendant la reperfusion.

#### 1.2.5.1 -- Le Pore de perméabilité membranaire mitochondrial

##### 1.2.5.1.1 Ancien et Nouveau paradigmes

Le pore de transition mitochondrial de perméabilité membranaire ou mPTP est un pore transmembranaire au niveau de la membrane interne et externe mitochondriale. Il n'est pas présent à l'état basal, mais se constitue au cours des processus d'ischémiques. Son « ouverture » est sous le contrôle de nombreuses molécules telles que les radicaux libres oxygénés (ROS), le phosphate inorganique (Pi), le pH, et que nous détaillerons plus avant. L'ouverture est responsable de la libération dans le cytosol de molécules pro-apoptotiques, de modifications des flux ioniques et du potentiel de membrane mitochondrial, d'une déplétion énergétique, d'altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Les premières données dans les années 1990 avaient mis en évidence que le pore mPTP était constitué par l'association de diverses protéines de la membrane mitochondriale (interne et externe) ainsi que de protéines solubles : le canal voltage-dépendant de la membrane externe (VDAC), l'adénine nucléotide transférase de la membrane interne (ANT), et la CyP-D provenant de la matrice interne.<sup>253</sup> Sous l'effet de molécules libérées au cours des processus ischémiques, les protéines ANT et VDAC s'associent pour former le pore mPTP. Cette association est dépendante de la présence de la Cyclophiline D (CyP-D) qui joue une fonction régulatrice sur ces deux protéines.<sup>251, 254</sup> La CyP-D se lie au complexe transmembranaire formé par ANT et VDAC. Dans cette conception du pore mPTP, les protéines ANT et VDAC en sont les constituants principaux (Figure 12).<sup>254, 255</sup>

Une conception différente et récente du pore mPTP a émergé ces dernières années, suite à des travaux sur les protéines ANT de type 1 et 2 de mitochondries de foie de souris KO. Cette

étude a montré que de fortes doses de  $\text{Ca}^{2+}$  provoquaient la formation et l'ouverture du pore mPTP même en l'absence de la protéine ANT.<sup>256</sup> Les auteurs concluent donc que ANT semble avoir davantage une fonction régulatrice au sein du pore que véritablement constitutionnelle.<sup>233</sup> Pour sa part la protéine VDAC a été aussi largement remise en question dans son rôle dans la constitution du pore. Baines et al. ont montré que le pore pouvait se former et s'ouvrir en l'absence de VDAC, prouvant ainsi que VDAC n'était pas non plus une protéine essentielle.<sup>257</sup>

La CyP-D joue encore un rôle déterminant dans la conception actuelle du pore.<sup>258</sup> La CyP-D est une protéine synthétisée dans le cytosol qui pénètre dans la mitochondrie. Les premiers travaux ayant mis en évidence l'implication de la CyP-D l'ont été par l'action pharmacologique de la Ciclosporine A.<sup>259, 260</sup> La Ciclosporine A (CsA) est un immunosuppresseur de la famille des immunophilines. Elle possède une action inhibitrice sur la Calcineurine et sur la CyP-D. La CsA inhibe la CyP-D. Mais là aussi de nouvelles données ces dernières années sont intervenues, par deux études publiées dans la revue *Nature*. Chez des souris Cyclophiline D-KO, lorsque l'on augmente suffisamment le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, on observe à nouveau l'ouverture du pore.<sup>261, 262</sup> Ces résultats ont confirmé que la CyP-D n'était pas un élément obligatoire du pore mPTP. La CyP-D aurait uniquement un rôle facilitateur de l'ouverture.<sup>263</sup> Les mécanismes d'action de la CyP-D et ses interactions avec les protéines de la membrane mitochondriale restent imparfaitement inconnus. La CyP-D se lie à la protéine ANT.<sup>254</sup> Néanmoins, certains auteurs pensent que la CyP-D avec le  $\text{Ca}^{2+}$  modifieraient la conformation de la protéine ANT, avec un effet synergique CyP-D/ANT sur l'ouverture du pore.<sup>252</sup>

Depuis l'émergence de cette nouvelle conception du pore mPTP supportée Halestrap et al.<sup>252</sup> le transporteur mitochondrial spécifique des ions phosphate (Phosphate inorganic carrier ou PiC) a pris de l'importance et pourrait s'avérer être finalement la protéine la plus essentielle au pore mPTP. Il semblerait que lorsque le PiC est inhibé l'ouverture du pore mPTP ne se produit pas.<sup>264</sup> De plus, le PiC peut se coupler à la CyP-D et à ANT.<sup>252</sup> Les modèles expérimentaux PiC-KO montrent une réduction de la sensibilité des cellules à l'apoptose.<sup>265</sup> Ainsi le pore mPTP pourrait être une émanation d'un complexe au maximum quadrimoléculaire "PiC-ANT-CyPD- $\text{Ca}^{2+}$ " mais non obligatoire dans sa forme complète

#### 1.2.5.1.2 Constitution du pore mPTP

Dans l'ischémie cérébrale, le pore mPTP se constitue et son ouverture est responsable de l'activation de mécanismes apoptotiques. Le  $\text{Ca}^{2+}$  est un médiateur majeur dans la constitution du pore par sa liaison à la CyP-D (Figure 10). L'ischémie est également responsable d'une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par plusieurs mécanismes.<sup>266</sup> D'abord l'activation des récepteurs membranaires AMPA et NMDA induit un afflux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le neurone postsynaptique. La déplétion en ATP altère le fonctionnement des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  membranaires.

Le  $\text{Na}^+$  intracellulaire est alors échangé par du  $\text{Ca}^{2+}$  par un transporteur.<sup>267, 268</sup> A la reperfusion le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire augmente davantage à cause de la surcharge acide  $\text{H}^+$  éliminés en échange d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . L'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est partiellement compensée par le stockage dans le RE et la mitochondrie.<sup>269</sup> La surcharge  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondriale favorise la formation du pore lorsque la capacité de recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  est dépassée.

Les ROS participent à l'ouverture du pore mPTP. Au cours de la reperfusion, les ROS augmentent par dysfonctionnements de la chaîne respiratoire. Le gradient électrochimique  $\text{H}^+$  n'est plus utilisé pour le fonctionnement de l'ATPsynthase, le flux d'électrons n'est plus transmis à la chaîne respiratoire et les ROS sont produits au niveau du complexe I et III. Au niveau du complexe IV, l' $\text{O}_2$  ne peut plus se lier aux ions  $\text{H}^+$ . L' $\text{O}_2$  résiduel forme des radicaux libres oxygénés  $\text{O}_2^-$ . D'autres Radicaux libres se forment par l'association avec du NO produit par la NOS des neurones et de la microglie. Enfin, la correction rapide du pH intracellulaire agit de manière synergique sur le pore mPTP à l'augmentation des ROS et du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire.<sup>270, 271</sup>

Le pore mPTP fait partie intégrante des voies de signalisation de l'apoptose mais est également régulé par les voies de survie cellulaire. L'apoptose peut être schématiquement scindée en deux principales voies de signalisation : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Figure 13). La voie extrinsèque est activée par des récepteurs membranaires de type « death receptors », qui activent une cascade mettant en jeu une série de caspases (3, 6 et 7) responsables de l'induction de signaux apoptotiques cellulaires. La voie intrinsèque est activée par divers signaux intracellulaires dont la mitochondrie. La voie caspase-dépendante est liée à la libération du cytochrome c. Dans le cytoplasme, le complexe « cytochrome c-procaspase 9-APAF1 » forment l'apoptosome. L'apoptosome est un complexe enzymatique permettant l'activation de la pro-caspase 9 en caspase 9 activé. La caspase 9 est une enzyme protéolytique effectrice de la fragmentation de l'ADN nucléaire. La voie caspase-indépendante est médiée par la libération des protéines apoptotiques AIF, endonucléase G, Smac/Diablo et Om/HtrA2. Cette voie est également responsable de la dénaturation de l'ADN nucléaire (Figure 13).<sup>269</sup> L'ouverture du pore mPTP aide à perméabilisation de la membrane externe mitochondriale s'associe à la libération des protéines pro-apoptotiques (AIF, Smac/Diablo, cytochrome c). En réalité, les facteurs pro-apoptotiques sont des grosses molécules qui ne passent pas au travers du pore mPTP. Ils traversent donc la paroi mitochondriale au niveau de brèches formées dans la membrane externe (Figure 13). La perméabilisation membranaire est multifactorielle: dysfonction de la phosphorylation oxydative, carence énergétique, fuite  $\text{Ca}^{2+}$ , puis la perte du potentiel transmembranaire.

Quant aux voies de signalisation de survie cellulaire qui interviennent sur la régulation du pore mPTP, la voie de signalisation RISK (Figure 11) et SAFE sont les principales.<sup>232</sup> Elles ont été beaucoup étudiées dans les modèles d'ischémie myocardique. Elles tendent à maintenir le pore mPTP fermé.<sup>232, 272</sup> Les principales kinases sont Akt, ERK1/2, GSK3- $\beta$  (Figure 11).

Le rôle fondamental du pore mPTP a été largement confirmé dans les travaux sur les modèles d'ischémie-reperfusion myocardique<sup>273, 274</sup> puis dans les études cliniques.<sup>275, 276</sup> Au final, le pore mPTP est une cible importante de plusieurs voies de signalisation neuroprotectrices et d'apoptose. L'ouverture du pore est responsable essentiellement d'une libération de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol, et s'associe à une ballonnisation des mitochondries ainsi qu'à l'activation des voies apoptotiques.

#### 1.2.5.1.3 Ischémie cérébrale adulte

L'histoire naturelle de l'ischémie cérébrale est complexe, implique le métabolisme énergétique de la cellule. La chaîne respiratoire mitochondriale est le site de production de l'ATP. Elle fonctionne par une succession de complexes enzymatiques, qui transporte un flux d'électrons permettant la création d'un gradient électrochimique  $\text{H}^+$  de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne (Figure 10). Le NADH et  $\text{FADH}_2$  sont deux molécules indispensables à cette libération des électrons libres dans la chaîne respiratoire ; le premier est en relation avec le complexe I, alors que le second est en relation avec le complexe II. Leur mise en jeu dépend essentiellement du type de substrat impliqué (fumarate, malate, succinate). Les substrats proviennent du catabolisme des lipides et des glucides à partir du cycle tricarboxylique (ou cycle de Krebs). La défaillance du métabolisme de la phosphorylation oxydative est précoce. L'effondrement de l'apport en oxygène et en glucose réduit l'activité du cycle de Krebs et la synthèse de NADH et  $\text{FADH}_2$ . En conditions d'anaérobiose, le glucose des réserves musculaires et hépatiques est mobilisé. Il devient le principal pourvoyeur énergétique via la glycolyse anaérobie dans le cytosol. Le glucose va produire quelques molécules d'ATP grâce aux réserves ADP et phosphocréatine. Le pyruvate formé n'est plus transformé par le cycle de Krebs, et se forme le lactate dans le cytosol.

On observe de profondes modifications du métabolisme mitochondriale davantage altéré dans le cœur que dans la pénombre.<sup>277</sup> La carence en ATP induit une perte de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  puis de celle des autres ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ ). Le fonctionnement des pompes membranaires ATP-dépendantes n'étant plus assuré. L'augmentation de la charge  $\text{H}^+$  et  $\text{K}^+$  de la cellule essaie de compenser le surcharge  $\text{Ca}^{2+}$  (Figure 10). Le  $\text{Ca}^{2+}$  excédentaire va être stocké au sein du RE et de la mitochondrie. Cette charge  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondriale libère les protéines pro-apoptotiques dans le cytosol (Figure 13). Le pore mPTP intervient dans la perméabilisation des membranes mitochondriales. Les caspases activées provoquent la peroxydation des protéines, des lipides et de l'ADN mitochondrial et nucléaire.<sup>278</sup>

L'implication du pore au cours de l'ischémie cérébrale a été démontrée par plusieurs études, par l'utilisation de la CsA. La CsA possède un effet inhibiteur sur la CyP-D. Cet effet a



d'abord été démontré dans le myocarde<sup>279</sup> puis dans l'ischémie myocardique.<sup>280, 281</sup> L'effet neuroprotecteur de la CsA a été mis en évidence dans des modèles d'ischémie focale transitoire.<sup>282-285</sup> La CsA (10mg/Kg) administrée à la reperfusion précoce ou retardée (5min et jusqu'à H6) réduisait le volume des lésions cérébrales chez le rat adulte.<sup>283</sup> L'inhibition de l'ouverture du pore mPTP n'était pas objectivée dans cette étude. Par la suite, Il a été mis en évidence pour la première fois par Matsumoto et coll. qui ont pu montrer que la CsA réduisait de plus de 50% le volume des lésions corticales, passant de 25% à 11% de volume lésionnel. Ils ont observés que la ballonisation des mitochondries était réduite, ce qui prouvait de manière indirecte que l'inhibition de l'ouverture du pore mPTP avait été effective.<sup>286</sup> Au cours des années suivantes, l'implication directe du pore mPTP a pu être démontrée dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire chez des souris CyP-D-KO.<sup>287</sup> Sur leurs mitochondries isolées de souris CyP-D-KO, les auteurs ont retrouvé une augmentation de la capacité de rétention du  $\text{Ca}^{2+}$  par la mitochondrie, signifiant une diminution de la facilité d'ouverture du pore mPTP. In vivo, le volume des lésions était diminué de 62% chez ces souris CyP-D-KO par rapport aux souris sauvages, confirmant le rôle neuroprotecteur central du pore mPTP et de la CyP-D.

La voie de signalisation RISK a été particulièrement bien décrite dans les travaux sur l'ischémie myocardique.<sup>288</sup> L'activation de RISK a été mise en évidence dans le pré- et le postconditionnement ischémique dans les modèles d'ischémie myocardique adultes.<sup>289</sup>

Pour finir, l'effet du NO est double au cours de l'ischémie. Il favorise aussi l'ouverture du pore mPTP via la production de radicaux libres, mais possède aussi des effets protecteurs en particulier par son action sur le pore  $\text{mK}^+$ -ATP dépendant (Figure 11).

#### 1.2.5.1.4 Ischémie cérébrale du cerveau immature

##### 1.2.5.1.4.1 Modèles d'ischémie anténatale

L'équipe d'Akihito Nakai a travaillé sur un modèle d'ischémie anténatale par occlusion de l'artère utérine. Leurs travaux nous aident à comprendre les mécanismes hémodynamiques et l'implication de la mitochondrie dans un cerveau en développement de fœtus. L'activité de la phosphorylation oxydative a été mesurée grâce à la mesure de la consommation d'O<sub>2</sub> par la mitochondrie en présence de substrats (ex: glutamate/malate) associés à l'ADP (état dit "stimulé" ou état 3) ou en absence d'ADP (état "non stimulé" ou état 4). Le ratio état 3 / état 4 représente le Respiratory Control Ratio (RCR) qui évalue la qualité de la respiration mitochondriale et la qualité du couplage des complexes de la chaîne respiratoire (Figure 14).<sup>290, 291</sup>

Dans le cerveau du raton de P0-P7, l'activité de la phosphorylation oxydative augmentait par rapport à la période fœtale (production d'ATP, augmentation du RCR, accroissement du couplage de la chaîne respiratoire). Ceci traduisait le rôle crucial du métabolisme oxydatif dans le cerveau immature, au moment de cette période transitionnelle de la naissance.<sup>292</sup> La maturation du métabolisme oxydatif mitochondrial pendant la vie fœtale semble s'effectuer de manière progressive pour s'adapter aux conditions de vie extra-utérine. Mais ces données renforcent pour certain l'hypothèse d'une plus grande susceptibilité du nouveau-né vis-à-vis des processus d'hypoxie-ischémiques.<sup>292</sup>

Pour comprendre les modifications métaboliques mitochondriales au court de l'ischémie néonatale, leurs travaux ont été poursuivis à partir d'un modèle d'ischémie anténatale chez une rate Wistar gestante de 20 jours. Le modèle consistait en une occlusion transitoire de l'artère utérine droite pendant 30 minutes. Les fœtus « ischémiés » de la corne utérine droite étaient comparés aux fœtus non ischémiés (groupe contrôle) de la corne utérine gauche.<sup>188</sup> Chez les fœtus ischémiés à 20 jours de gestation, la respiration mitochondriale montrait une diminution de 45% du RCR par rapport aux animaux contrôles. A la reperfusion, le RCR augmentait pour récupérer à 1 h une activité presque normale, alors qu'une détérioration apparaît vers la 4<sup>ème</sup> heure. Cette détérioration secondaire traduisait un déficit énergétique. Les auteurs montraient que la CsA pouvait réduire le nombre de cellules ballonisées et améliorer la récupération du RCR. Ils en ont conclu à l'implication du pore mPTP dans cette détérioration énergétique secondaire.<sup>293, 294</sup>

Cette altération secondaire du métabolisme énergétique ("second energetic failure") avait été mise en évidence auparavant dans des modèles d'ischémie cérébrale adultes<sup>295, 296</sup> ainsi que dans des modèles d'ischémie du jeune.<sup>297, 298</sup> La sévérité de cette détérioration énergétique secondaire était directement liée à la sévérité de l'épisode ischémique et à la profondeur de la faillite énergétique primaire.<sup>297</sup> Les résultats de ces travaux décrivaient ce métabolisme transitionnel entre le fœtus et le nouveau-né.

En résumé, le métabolisme oxydatif mitochondrial ainsi que le pore mPTP jouent un rôle fondamental au décours de l'ischémie cérébrale dans la survenue du déficit énergétique retardé et dans la mise en place des processus d'apoptose. Le pore mPTP semble donc une cible privilégiée de neuroprotection dans l'H-I de cerveau immature comme celui de l'adulte (Figure 14).

#### 1.2.5.1.4.2 Modèles d'ischémie postnatale

Chez le jeune, comme chez l'adulte, l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intra-mitochondrial favorise l'ouverture du pore mPTP. Ce phénomène a été observé dès 30mn après la reperfusion dans le cerveau immature.<sup>299</sup> De même, les ROS et RNS, la consommation de l'ATP, ou l'augmentation rapide du pH à la reperfusion permettent l'ouverture du pore mPTP.<sup>300</sup>

Dans le modèle d'H-I chez le raton P7<sup>26</sup> la première description de l'implication du pore mPTP à la reperfusion a pu être mis en évidence par la mesure de l'accumulation de [ $^{14}\text{C}$ ]deoxy-glucose-6P.<sup>299</sup> Ce traceur radioactif s'accumule dans la mitochondrie lorsque le pore s'est formé. A 90 min et à 8 h, l'accumulation du traceur est maximale, comme l'ouverture du pore. Cette description est concordante par rapport aux données concernant l'évolution en deux phases du déficit énergétique et de l'apoptose à la reperfusion.<sup>297</sup> Dans cette même étude, les auteurs mettaient en évidence un point fondamental et original de ce travail: la CsA ne réduisait pas les lésions cérébrales. Ce résultat était interprété comme remettant en question le rôle de la CyP-D dans la constitution du pore mPTP dans l'ischémie du cerveau immature. En effet, si la CsA est inefficace, alors le pore n'a pas besoin de CyP-D pour s'ouvrir. Les auteurs faisaient l'hypothèse que cette différence pourrait être liée à une constitution particulière du pore mPTP chez le jeune.<sup>301</sup> A dire vrai, cette hypothèse n'est pas entièrement discordante par rapport aux travaux récents dans l'ischémie adulte. Toutefois, cet élément n'a pas été confirmé dans d'autres modèles néonataux.

L'expression de la CyP-D est différente chez le jeune et chez l'adulte. Dans l'H-I chez souris P9 CyP-D KO, les auteurs rapportaient une augmentation des lésions cérébrales, alors que chez les souris CyP-D KO adultes ils observaient une diminution des lésions.<sup>302</sup> Par ailleurs, l'expression de Bax semblait supérieure chez la souris juvénile CyP-D KO. De plus, l'inhibition de Bax était responsable d'une réduction de 42% du volume des lésions chez les souris traitées versus non traitées.<sup>303</sup> Les souris traitées présentaient aussi une réduction de la libération de molécules proapoptotiques (cytochrome c et AIF) et une réduction de la perméabilité membranaire. Ces résultats mettaient en évidence le rôle de Bax dans l'ischémie cérébrale du jeune. Ainsi, à la différence de l'ischémie adulte, la perméabilisation des membranes mitochondriales chez le jeune semblaient davantage s'exprimer par une relation Bax-dépendante et caspase-dépendante que

par une relation CyP-D dépendante.<sup>302</sup> De plus, la CyP-D pourrait même avoir un effet "paradoxal", inhibiteur sur le pore mPTP.

En résumé, les mécanismes d'apoptose s'expriment fortement au cours de la vie fœtale et néonatale. Ils sont intimement liés au développement cérébral dans un cerveau immature. La forte expression à l'état basal de molécules comme Bax <sup>304</sup>, Bcl-2 <sup>305</sup> ou la caspase 3 <sup>31</sup> sont l'expression de ces mécanismes.<sup>306</sup> Le rôle du pore mPTP, déjà une cible thérapeutique avérée dans l'ischémie myocardique. Chez le jeune, comme chez l'adulte, l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intra-mitochondrial favorise l'ouverture du pore mPTP. Ce phénomène a été observé dès 30mn après la reperfusion dans le cerveau immature.<sup>299</sup> De même, les ROS et RNS, la consommation de l'ATP, ou l'augmentation rapide du pH à la reperfusion permettent l'ouverture du pore mPTP.<sup>300</sup> Désormais Il semble que le pore mPTP aille devenir une nouvelle cible thérapeutique privilégiée dans l'ischémie cérébrale néonatale.<sup>307 185, 302</sup>

### 1.2.5.2 -- Le métabolisme oxydatif

Le métabolisme oxydatif de la mitochondrie, ou phosphorylation oxydative, a pour fonction la synthèse d'ATP en condition d'aérobiose. Le cycle de Krebs fournit le substratum nécessaire au fonctionnement de la chaîne respiratoire, dont le but final est la synthèse de quantité importante d'ATP. La mitochondrie aide aussi à la détoxification des radicaux libres, à la régulation du métabolisme  $\text{Ca}^{2+}$ , le maintien de l'homéostasie mitochondrial et du potentiel transmembranaire.

#### 1.2.5.2.1 Explorations de la respiration mitochondriale

L'exploration expérimentale de la phosphorylation oxydative nécessite des techniques sophistiquées. Les méthodes dérivent directement des travaux expérimentaux de Chance et Williams.<sup>290, 291, 308-310</sup> L'interprétation des résultats est souvent délicate, car la mitochondrie est en interaction étroite avec le milieu et avec la situation métabolique de la cellule, et ce contexte n'est pas toujours évident à appréhender. Les explorations peuvent être réalisées in vitro sur mitochondries purifiées et isolées, ou bien sur des cellules vivantes. Les explorations in vivo peuvent se faire par l'intermédiaire de techniques biochimiques, radiologiques ou métaboliques. Nous ne détaillerons pas dans ce chapitre ces techniques in vivo, nous ciblerons les techniques in vitro. Les explorations sur mitochondries isolées ont l'avantage d'être faciles de réalisation, de pouvoir contrôler les conditions expérimentales, et d'éviter les interférences avec les éléments du cytosol. Les explorations sur cellules isolées permettent de mieux appréhender la situation métabolique globale de la cellule, mais sont techniquement et expérimentales plus délicates. Nous détaillerons les deux types de méthodes, en insistant surtout sur l'interprétation des résultats (pour plus d'information se référer à cette excellente revue, principale ressource bibliographique de ce chapitre: Brand MD, biochem J 2011<sup>311</sup>).

Afin de comprendre l'utilisation, l'interprétation et les limites de ces techniques, il est indispensable de comprendre la physiologie de la phosphorylation oxydative et les enjeux pour la mitochondrie. L'objectif final de la respiration mitochondriale est bien la production d'énergie (sous forme d'ATP) par la chaîne respiratoire. Pour cela, la mitochondrie a besoin de substrats énergétiques sous la forme de NADH et de  $\text{FADH}_2$  produits par le cycle de Krebs, voie finale de dégradation des protéines, lipides et glucides. En conditions physiologiques aérobies, le cycle de Krebs est la principale source de substrat de la chaîne respiratoire. En condition anaérobie, la glycolyse seule permet la synthèse d'ATP mais de manière bien plus limitée. La chaîne respiratoire joue un rôle fondamental dans le maintien du gradient de protons  $\text{H}^+$  entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire (Figure 14). Le NADH et  $\text{FADH}_2$  libèrent des  $\text{H}^+$  et

des électrons libres grâce aux complexes I et II. Le transfert des électrons libère l'énergie nécessaire afin de permettre la sortie des ions  $H^+$  vers l'espace intermembranaire. Le gradient transmembranaire  $H^+$  entre la matrice interne et l'espace intermembranaire est un élément indispensable au potentiel de membrane.<sup>312</sup> Au niveau du complexe IV, les ions  $H^+$  en présence d' $O_2$  sont éliminés sous forme d' $H_2O$ . Le gradient transmembranaire  $H^+$  est aussi appelé "proton motrice force" (pmf). La pmf est nécessaire au fonctionnement de l'ATP-synthase (complexe V). En effet, le flux de ré-entrée  $H^+$  vers la matrice active l'ATP-synthase. L'ATP-synthase fonctionne comme une turbine dont la force motrice est le gradient  $H^+$ . ADP et Phosphate inorganique ( $P_i$ ) activent la synthèse d'ATP au niveau de la membrane interne. Enfin, Il existe des transporteurs  $Na^+/H^+$  et  $Na^+/Ca^{2+}$  au niveau de la membrane interne permettant la régulation des flux de  $H^+$ . La fuite protonique correspond à la "ré-entrée" passive  $H^+$  à (espace intermembranaire vers matrice) à travers la membrane interne, proportionnelle à la pmf.

La respiration mitochondriale peut être évaluée par la consommation d' $O_2$  de la mitochondrie (en mmol  $O_2$ /min/mg de protéine mitochondriale). La consommation d'oxygène est reliée à la consommation énergétique. L'énergie utilisée par la mitochondrie sert essentiellement au maintien de la pmf (consommateur d'énergie pour compenser la fuite protonique) et aussi à la production d'ATP. La respiration mitochondriale est évaluée par différents états correspondant à une des situations métaboliques particulières. Le couplage chimio-osmotique de la chaîne respiratoire est une relation existante entre le flux d'électrons dans la chaîne respiratoire et le flux de sortie de  $H^+$  à travers la membrane mitochondriale interne.<sup>313</sup> La relation du couplage chimio-osmotique s'établit donc entre les réactions d'oxydo-réduction et les réactions de phosphorylation. Le couplage de la chaîne respiratoire est optimal lorsque la quantité d'énergie libérée par les électrons dans la chaîne respiratoire est utilisée totalement pour alimenter le flux de sortie  $H^+$  qui s'oppose à la fuite protonique, et le flux de ré-entrée de  $H^+$  utile à l'ATP-synthase. On parlera de découplage de la chaîne respiratoire lorsqu'une partie d'énergie libérée est dissipée, et n'est pas utilisée pour la synthèse d'ATP.

L'exploration de la respiration mitochondriale (sur mitochondrie isolée) est le plus souvent évaluée par la mesure de deux états en conditions différentes: état 3, état 4, et RCR correspondant au ratio état 3 / état 4.<sup>311</sup> L'état 3 correspond à la consommation en  $O_2$  par la mitochondrie en présence d'ADP. Il évalue la qualité du couplage de la chaîne respiratoire et la production d'ATP. L'état 4 correspond à la consommation d' $O_2$  sans présence d'ADP (sans activité ATP-synthase). Il évalue la consommation d' $O_2$  utilisée pour s'opposer à la fuite protonique. La vitalité des mitochondries se traduit par un état 3 élevé, un état 4 bas et un RCR élevé. Un RCR bas ou effondré traduit la dysfonction respiratoire mitochondriale. Ces trois paramètres estiment assez bien le bon fonctionnement de la phosphorylation oxydative. L'utilisation d'un inhibiteur de l'ATP-synthase (oligomycine) et d'un agent découpleur (FCCP) permet de définir un état 3u dit non-couplé ("uncoupled") qui aide à préciser le type de dysfonction incriminé. A la mesure des états 3 et 4 précédents, d'autres analyses plus avancées peuvent ensuite être réalisées. Elles

utilisent des inhibiteurs d'ATPase, des inhibiteurs de la chaîne respiratoire, et des découpleurs ionophoriques de la chaîne respiratoire.<sup>311</sup> Pour les principaux inhibiteurs utilisés citons: le Roténone (complexe I), le Malonate (complexe II), Antimycine A ou Le Myxothiazol (Complexe III), le Cyanure ou CO (Complexe IV), l'Oligomycine (Complexe V ATP-synthase). Les découpleurs empêchent le transfert de l'énergie entre les enzymes de l'oxydo-réduction (via la libération d'électrons libres) et l'ATP-synthase. Les principaux agents découpleurs utilisés sont les Phénols substitués, les phénylhydrazones (FCCP) qui rendent la membrane interne perméable au H<sup>+</sup> (appelées protophore). Le résultat est une fuite protonique qui réduit la pmf. Par la suite, les réactions d'oxydo-réductions s'accroissent fortement pour compenser la fuite et tenter de maintenir le pmf: le "pompage" actif H<sup>+</sup> vers l'espace intermembranaire. C'est pourquoi les agents découplants sont des activateurs de la respiration mitochondriale et des oxydations cellulaires. Quant aux principaux substrats utilisés, citons malate + pyruvate ou malate + glutamate équivalents à un substrat NADH-like (complexe I), et fumarate équivalant à un substrat FADH<sub>2</sub>-like (spécifique du complexe II). Notons que dans les études menées dans l'ischémie, le type de substrat utilisé ne semblerait pas modifier l'interprétation générale des résultats.<sup>314-316</sup> Les autres paramètres disponibles pour l'évaluation de la respiration mitochondriale, comme le rapport P/O, la mesure direct du potentiel de membrane mitochondrial, l'activité de chaque complexe (I, II, III, IV et ATP-synthase) peuvent apporter des éléments qualitatifs supplémentaires.

L'exploration de la respiration cellulaire sur cellules isolées est plus complexe mais apporte d'autres éléments de compréhension de la respiration mitochondriale.<sup>311</sup> Les analyses permettent de préciser le type d'altération de la phosphorylation oxydative en "conditions cellulaires".

Enfin, notons que d'autres explorations peuvent être nécessaires pour l'évaluation des autres grandes fonctions mitochondriales, tel que la production de radicaux libres, la détoxification, le dosage de protéines spécifiques (glutathion, protéines pro-apoptotiques).

#### 1.2.5.2.2 Ischémie cérébrale du cerveau adulte

L'altération de la respiration mitochondriale a été montré dans l'anoxo-ischémie, dans l'ischémie cérébrale focale, globale <sup>317</sup> et pour plusieurs espèces.<sup>318, 319</sup> Pendant l'ischémie, l'activité de la chaîne respiratoire décroît de même que le pmf.<sup>277</sup> L'ischémie est responsable d'une chute de l'activité de l'état 3 sans modification de l'état 4, à la fois dans la zone de pénombre et dans la zone du cœur.<sup>295, 315, 316, 320, 321</sup> Schématiquement, la stabilité de l'état 4 pendant l'ischémie est la traduction de la préservation des activités métaboliques mitochondriale en condition d'anaérobiose. Le RCR est effondré dû fait de la chute de l'état 3.<sup>321</sup> Les autres marqueurs du métabolisme mitochondrial chutent également, comme la production d'ATP, la réduction des réserves de phosphocréatine et l'augmentation du taux de lactate.<sup>296</sup> L'effondrement des activités métaboliques de la mitochondrie est toujours plus marqué dans le cœur que dans la pénombre.<sup>295,</sup>

<sup>296</sup> Selon les études, l'état 3 diminue de 45-60 % dans le cœur et seulement de 15-40% dans la pénombre.<sup>322</sup> La dégradation de l'état 3 se poursuit progressivement entre 1 h et 3 h d'ischémie.<sup>315</sup> Il semblerait que la durée de l'ischémie soit corrélée à la sévérité de l'atteinte de la chaîne respiratoire.<sup>315, 316</sup>

Les complexes de la chaîne respiratoire ne subissent pas l'ischémie de manière identique. Chez des rats, l'ischémie affectait le complexe IV ainsi que le cytochrome c avec une réduction de 57% d'activité.<sup>323, 324</sup> Ces résultats ont été ensuite retrouvés chez le rat après 2 heures d'occlusion de la MCA: réduction de 27% de l'activité complexe IV, alors que les complexes I, II, III et V n'étaient pas touchés.<sup>325</sup> La pénombre était davantage protégée avec une diminution d'activité de seulement 17% de. Néanmoins, des résultats contradictoires ont aussi été retrouvés dans d'autres modèles, comme chez la gerbille. Les auteurs observaient une préservation de l'activité du complexe IV et une réduction de tous les autres.<sup>320</sup> Au final, ces données montrent seulement qu'il existe de nombreux facteurs qui influencent la respiration mitochondriale au cours de l'ischémie, comme la collatéralité et le DSC. Ces éléments déterminent la sévérité de la dysfonction de la phosphorylation oxydative.<sup>128, 326</sup> A la reperfusion, la restauration de la perfusion cérébrale et de l'oxygénation tissulaire permettent initialement une amélioration de la phosphorylation oxydative.

Les travaux expérimentaux de l'équipe de Siesjö ont beaucoup fait avancer la compréhension du métabolisme mitochondrial dans l'ischémie-reperfusion. Dans un modèle d'ischémie globale chez le rat, Rehnckrona et al. ont montré une récupération précoce et complète de l'état 3 et du RCR après 30 min de reperfusion.<sup>314</sup> Hillered a confirmé ces mêmes résultats pour une reperfusion de 60min.<sup>316</sup> Dans un modèle d'ischémie focale chez le rat, la reperfusion restaurait complètement l'activité de la chaîne respiratoire dans la pénombre dès 1h de reperfusion.<sup>315</sup> Néanmoins, la récupération n'était que partielle au niveau du striatum. De plus, la phosphorylation oxydative était toujours améliorée jusqu'à 3 h de la reperfusion.<sup>315, 327</sup> Li et al. rapportent eux une récupération partielle dans le cortex et dans l'hippocampe après une ischémie de 30min.<sup>327</sup> D'autres auteurs retrouvent que cette normalisation d'activité ne dure que jusqu'à 1 h avant que ne survienne une dégradation secondaire dès 2 h jusqu'à 4 h de reperfusion.<sup>295, 296, 321</sup> Cette seconde dégradation de la respiration mitochondriale est en rapport avec un déficit énergétique, et reste davantage marquée dans le cœur que dans la pénombre.<sup>295, 296</sup> L'activité des complexes I, II, III et V semblerait normale à la reperfusion. Mais celle du complexe IV se normalise secondairement malgré une tendance à une baisse d'activité vers 4 h.<sup>325</sup> Au total, ces résultats montrent que la récupération de l'activité de la phosphorylation oxydative peut être partielle ou complète au cours des premières heures de la reperfusion selon les modèles. Par ailleurs, la dégradation secondaire de l'activité de la chaîne respiratoire semble constante, survenant avec un délai variable après le début de la reperfusion.



Dans les processus d'ischémie-reperfusion, les ROS participent aux RI par la peroxydation des lipides membranaires et la protéolyse. L'oxydation des protéines affecte les complexes.<sup>312, 328</sup> Toutefois, Il ne semble pas que l'on puisse expliquer cette défaillance énergétique secondaire uniquement par le niveau d'activité des complexes. Au final, la durée de la récupération varie selon les modèles considérés. Les éléments explicatifs pourraient être en rapport avec la technique chirurgicale, les anesthésiques, la durée de l'ischémie, la "qualité" de la reperfusion, la mise en place de la collatéralité, ainsi qu'au DSC.<sup>315</sup>

L'implication du DSC dans la survenue de la dysfonction respiratoire et dans le déficit énergétique secondaire a été abordée dans l'étude de Nakai. Dans un modèle d'ischémie focale par occlusion transitoire de l'ACM chez le rat, Les auteurs ont monitoré la respiration jusqu'à 4 h de reperfusion, de manière conjointe à une évaluation de la perfusion tissulaire par Laser doppler.<sup>321</sup> Le FST se normalisait rapidement à la reperfusion, mais sans que l'on observe une phase hyperhémique précoce. De même, ils n'observaient pas d'hypoperfusion secondaire, et la pression tissulaire en oxygène était supranormale.<sup>321</sup> Ainsi, ces résultats avaient tendance à s'opposer à l'hypothèse d'une participation importante de l'hémodynamique dans la défaillance mitochondriale secondaire. Néanmoins, il faut noter que le monitoring de la microcirculation cérébrale ne ciblait pas spécifiquement à mettre en évidence les modifications hémodynamiques très précoces à la reperfusion, afin de déceler une hyperhémie.<sup>184, 327, 329-331</sup> Par ailleurs, dans les conditions expérimentales décrites, l'hyperoxie tissulaire est difficilement explicable en dehors d'une augmentation du DSC. Au total, cette étude ne permet pas à elle seule d'éliminer le rôle des troubles hémodynamiques dans la constitution de la défaillance énergétique secondaire.

Une autre piste développée fût celle du stress oxydatif et des radicaux libres produits en excès à la reperfusion. L'emploi du PBN ( $\alpha$ -phenyl- N-tert-butyl nitrone, chélateur de ROS) avait montré qu'il rétablissait l'activité de l'état 3 et du RCR à 4 h de la reperfusion.<sup>295, 296</sup> Ces travaux mettaient ainsi en avant la place du stress oxydatif dans la détérioration énergétique secondaire. Cet effet reverse a été observé avec le FK506 (Tacrolimus®, analogue de la CsA) inhibiteur de la Calcineurine et à moindre degré du pore mPTP<sup>321</sup> dont les effets neuroprotecteurs ont déjà été prouvés dans l'ischémie cérébrale.<sup>332</sup>

La CsA a été testé pour répondre à cette problématique: existe-t-il une relation entre respiration mitochondriale, pore mPTP, et reperfusion?<sup>333</sup> La CsA administrée à 6 h de la reperfusion corrigeait la défaillance secondaire de la respiration mitochondriale, en améliorant l'état 3 et le RCR.<sup>327</sup> La CsA réduisait à la fois l'intensité de l'hyperhémie et à la fois l'intensité de l'hypoperfusion secondaire. Cette étude mettait en évidence que la CsA agissait sur la respiration mitochondriale et sur la diminution de la défaillance énergétique secondaire (probablement par un effet sur le pore mPTP et sur l'amélioration de la vitalité des mitochondries). La CsA pourrait également agir par un effet sur la microcirculation cérébrale, en limitant l'hyperhémie par le biais d'une réduction de la production des ROS et de NO..<sup>334</sup>

#### 1.2.5.2.3 Ischémie cérébrale du cerveau immature

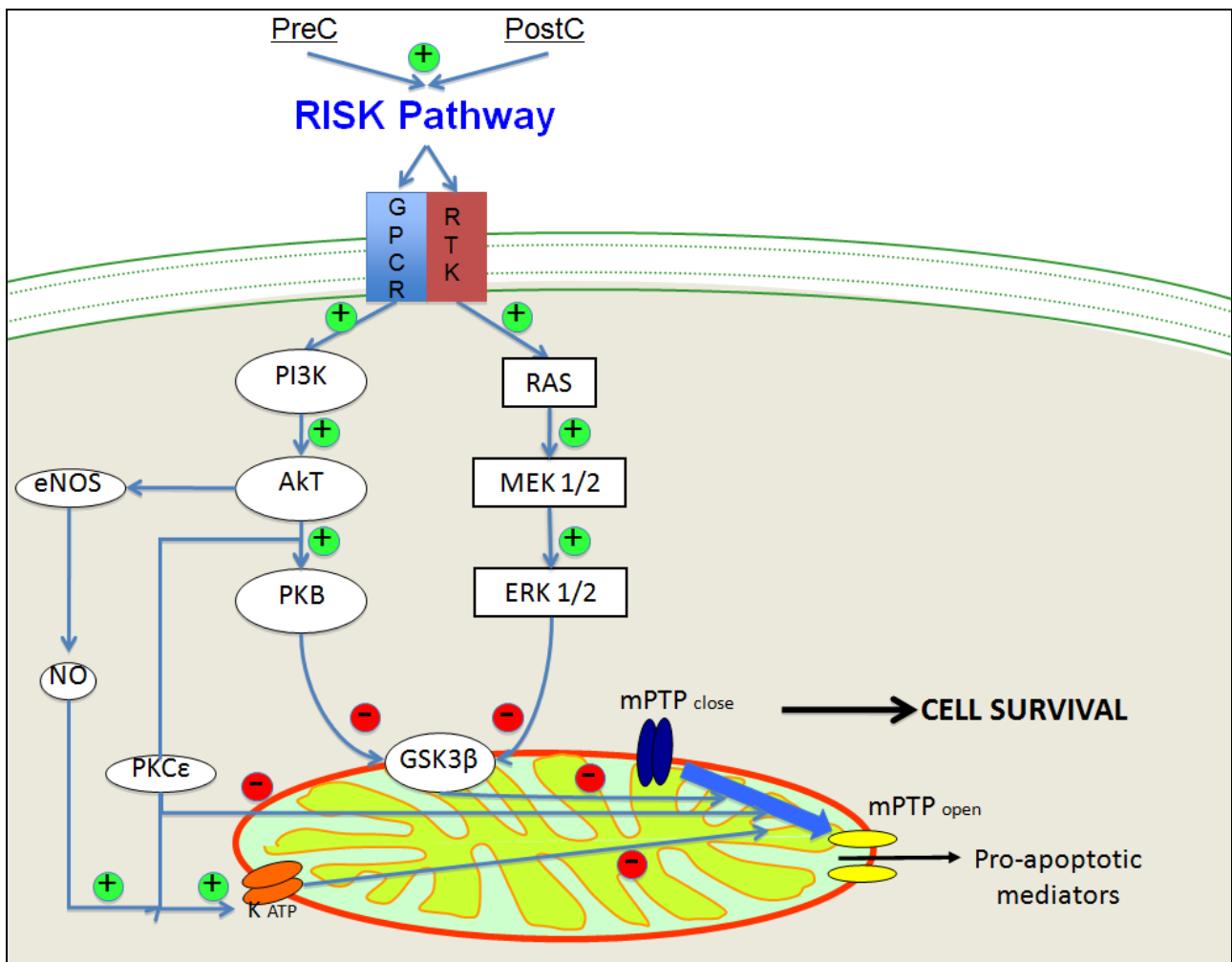
La respiration mitochondriale a également été explorée dans plusieurs modèles animaux d'ischémie ou d'hypoxie néonatale. Des différences certaines ont été mises en évidence par rapport aux données de l'ischémie adulte, et s'expliquent par des spécificités du cerveau immature. Quels que soient les modèles, on observe toujours un effondrement des paramètres de la respiration mitochondriale (état 3 et RCR) pendant la phase d'ischémie. La réduction de l'activité de la phosphorylation oxydative était de 30 % après une période d'asphyxie chez l'agneau<sup>335</sup> de 50 % dans le modèle d'H-I de Rice chez un raton P7<sup>299</sup> et de 30% chez la souris P9.<sup>336</sup> L'état 4 n'était pas constant même au cours de l'ischémie, pouvait être diminué de plus de 30% dans certains modèles asphyxiques, comme pour des agneaux avant P3.<sup>335</sup> Dans les modèles d'ischémie focale, il semblerait que l'état 4 varie généralement peu. L'évolution du RCR est alors bien corrélée à la variation de l'état 3. Néanmoins, cette réduction n'était pas notée pour le modèle chez l'agneau réalisé après P3. Il semblerait donc que l'âge postnatal influencerait le niveau de l'état 4.<sup>335</sup> Une autre étude est venue confirmer cette hypothèse, montrant que l'état 3 et l'état 4 étaient variables selon l'âge postnatal chez le rat immature, mais également par rapport au rat adulte.<sup>292</sup> Les explications avancées étaient probablement à rechercher dans le lien entre la période anténatale et postnatale. En période anténatale, l'augmentation de l'activité de l'état 3 traduit l'augmentation d'activité de la chaîne respiratoire pour le développement cérébral, sans modification notable de l'état 4. En période postnatal, on note une réduction de l'état 3 et de l'état 4 de J0 à J7 de vie, associé à une amélioration du RCR.<sup>292</sup> Les explications sont probablement à rechercher dans le lien entre la période anténatale et postnatale. En période anténatale, l'augmentation de l'activité de l'état 3 traduit l'augmentation d'activité de la chaîne respiratoire pour le développement cérébral, sans modification notable de l'état 4. En période postnatal, on note une réduction de l'état 3 et de l'état 4 de J0 à J7 de vie, associé à une amélioration du RCR.<sup>292</sup> L'amélioration du couplage de la chaîne respiratoire semblerait être une étape indispensable à la maturation cérébrale, la prolifération et la différenciation neuronale postnatale. Cette période transitionnelle est aussi une période critique pour le cerveau immature, plus fragile aux agressions en particulier ischémique. Ces travaux mettent encore en exergue les spécificités du cerveau en développement.

Au cours de la reperfusion, la récupération de l'activité de la chaîne respiratoire est très souvent uniquement partielle. Le «timing» de la restauration de l'activité de la chaîne respiratoire a été décrit dans le modèle Rice.<sup>337</sup> L'état 3 et le RCR augmentaient progressivement de 0 à 8h. La récupération maximale était de 80% pour l'état 3 et de 70% pour le RCR. Les autres indices métaboliques évoluaient dans le même sens, tant pour l'ATP, la phosphocréatine et le lactate. La

récupération de la défaillance énergétique initiale semblerait apparaître précocement dès la reperfusion.<sup>338</sup> Cette récupération peut être complète et précoce dès 1 h, comme dans l'H-I chez la souris P9<sup>336</sup> ou l'ischémie fœtale chez le rat.<sup>293</sup> Cependant, on observe de manière constante dans tous les modèles expérimentaux vers 4-6 h, une seconde détérioration de la respiration mitochondriale signe d'une défaillance énergétique secondaire, comme ce qui est observé dans le cerveau adulte.<sup>293, 336-339</sup> Les mécanismes de cette seconde défaillance énergétique sont mal élucidés, et vraisemblablement multifactoriels. La mise en évidence d'une forte activité caspase 3 dans les cellules cérébrales ischémiées entre 8 à 24 h de reperfusion indique qu'il existerait bien une relation entre la défaillance de la respiration mitochondriale et l'activation des processus apoptotiques.<sup>299</sup> En effet, l'apoptose évolue aussi le plus souvent en deux phases, une précoce et une tardive.<sup>37, 39, 41, 340</sup> La cinétique de l'apoptose et celle de la défaillance énergétique secondaire sont superposables, mais ne suffit pas à prouver une relation entre les deux phénomènes. La preuve du lien est venue de l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs NMDA. L'effet anti-NMDA mettait en évidence une réduction du déficit énergétique secondaire, prouvant dès lors le lien avec les mécanismes excitotoxiques.<sup>338</sup>

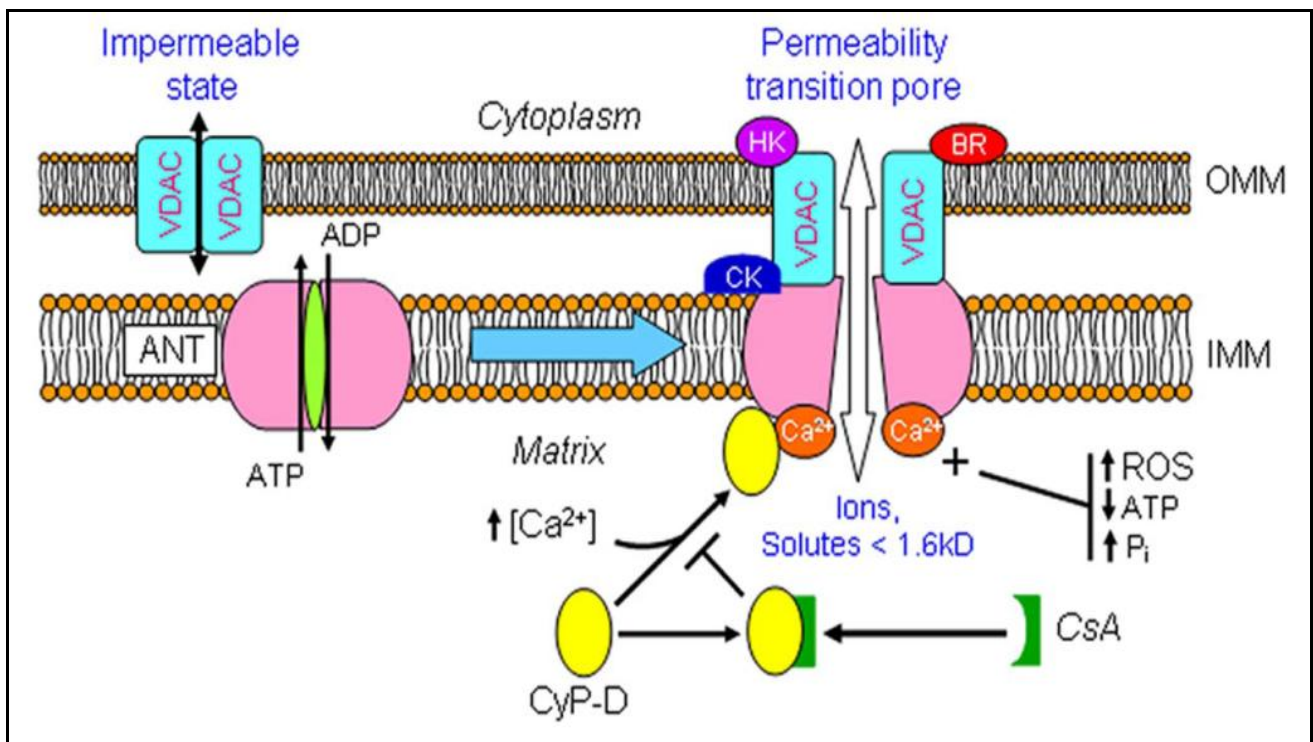
Le rôle des radicaux libres semble également important. Les agents anti-oxydants, tel que le PBN, réduisent la défaillance énergétique secondaire et améliorent le fonctionnement de la chaîne respiratoire.<sup>188</sup> De même, l'injection de Pyridaben, inhibiteur du complexe I, contribue à réduire la détérioration de la phosphorylation oxydative au cours de la reperfusion, par la réduction de la synthèse des radicaux libres par la chaîne respiratoire.<sup>339</sup>

Le pore mPTP modifie l'équilibre électrochimique de la mitochondrie par la libération de  $\text{Ca}^{2+}$ , les altérations du pmf, et de manière indirecte la chaîne respiratoire. Pour le prouver, la CsA a été utilisée pour freiner l'ouverture du pore PTP. La CsA administrée 1 h après la reperfusion améliorait le RCR à 4 h de la reperfusion, et réduisait fortement la quantité de cellules en voie d'apoptose.<sup>293</sup> Les résultats contradictoires de l'étude de Puka-Sundvall nuancent ces données. Les auteurs ne retrouvaient aucune efficacité chez le rat P7 concernant l'amélioration de l'activité de la chaîne respiratoire par la CsA.<sup>341</sup> Par la suite, ils ont montré que la CyP-D n'était pas un élément indispensable à l'ouverture du pore mPTP chez le rat nouveau-né<sup>302</sup> à la différence de l'adulte.<sup>282, 286, 342</sup> Certaines critiques peuvent être apportées à ces travaux. Premièrement, seul le modèle d'H-I a été étudié pour évaluer le rôle de la CsA sur le pore mPTP et en postnatal. Cette limitation est importante puisque les preuves d'efficacité de la CsA chez l'adulte concernent essentiellement des modèles d'ischémie focale. Deuxièmement, l'absence d'efficacité de la CsA pourrait être liée à la procédure chirurgicale utilisant l'insertion d'une aiguille en intracérébrale pour permettre l'ouverture de la BHE.<sup>341</sup> Cet élément pourrait expliquer dans ce modèle un effet délétère de cette procédure, réduisant un possible effet protecteur de la CsA sur le volume des lésions cérébrales et sur l'amélioration des indices du métabolisme énergétique mitochondrial (lactate et ATP).<sup>343</sup> Ainsi, Le débat concernant le rôle du pore mPTP dans l'ischémie cérébrale et celui de la CsA sur le métabolisme mitochondrial du jeune n'est pas encore tranché.



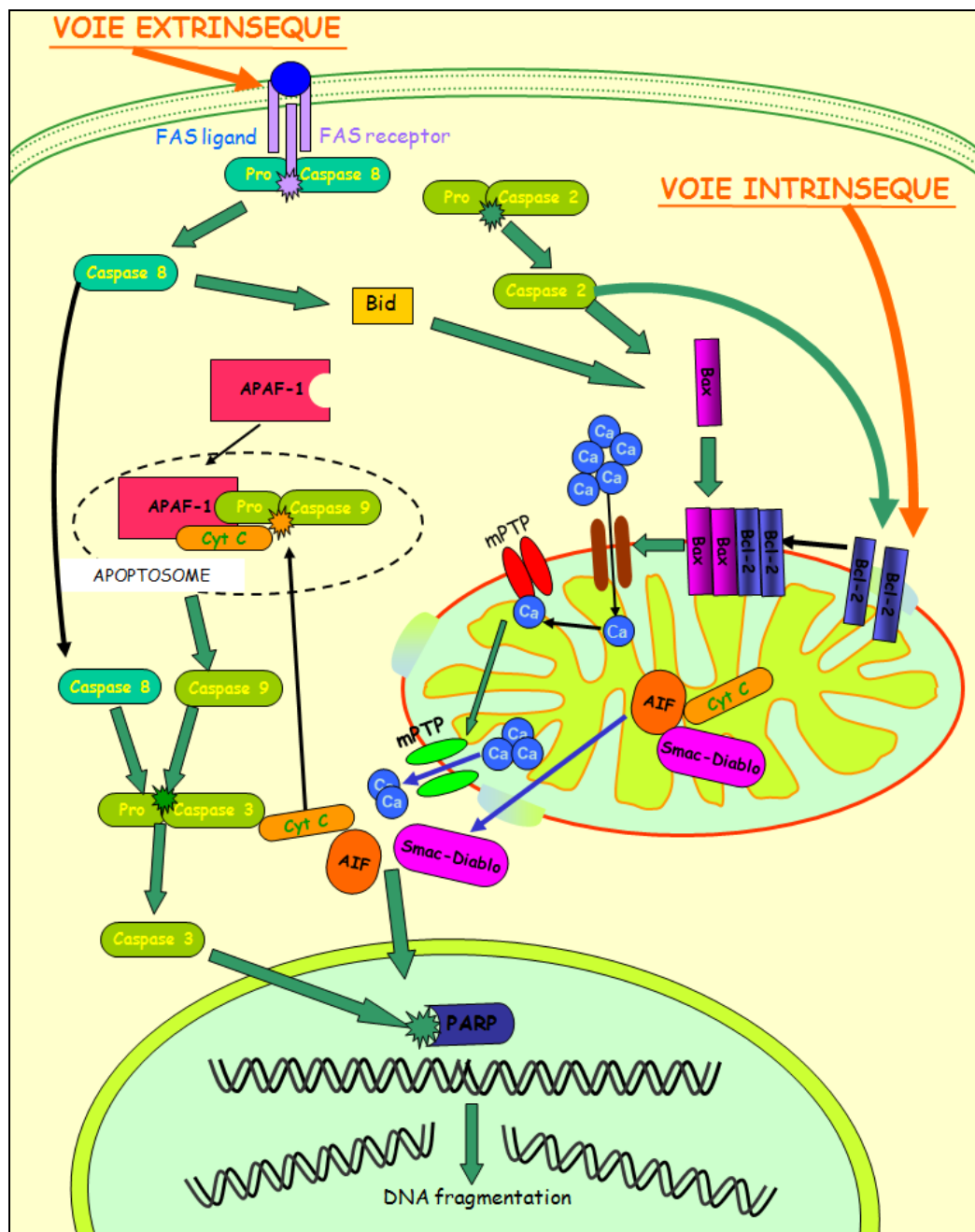
**Figure 11**

**Relation postconditionnement ischémique, voie de signalisation RISK et pore mPTP** Le postconditionnement agit sur des récepteurs membranaires de type tyrosine kinase (RTK) et les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). La voie RISK est composée d'une cascade de kinases, dont la cible finale est la mitochondrie. La GSK3-β favorise l'ouverture du pore mPTP. La voie RISK inhibe la GSK3-β et permet au pore de rester « fermé ». La voie RISK fait également intervenir la eNOS par l'intermédiaire d'Akt. La production de NO favorise l'ouverture du canal K<sup>+</sup>ATP. L'entrée de K<sup>+</sup> dans la cellule inhibe l'ouverture du pore mPTP. PreC= Préconditionnement ; PostC= Postconditionnement ; voie RISK= Reperfusion Injury Salvage Kinases; CGPR = Récepteur Couplé aux Protéines G; RTK= Récepteur Tyrosine Kinase; mPTP= pore mitochondrial de Permeabilité membranaire ; eNOS = NO synthase endothéliale; canal K<sup>+</sup>ATP



**Figure 12**

**Modèle structural et fonctionnel du pore mPTP (Javadov, Cell Physiol Biochem 2007)** Le pore mPTP dont la structure exacte est inconnue est un assemblage multiprotéique connu sous deux configurations: fermée où la membrane mitochondriale interne est imperméable, et ouverte induite par le  $\text{Ca}^{2+}$ . La Cyp-D est nécessaire à l'ouverture du pore. La CsA inhibe l'effet de la CyP-D. mPTP= pore mitochondrial de Perméabilité membranaire CyP-D= Cyclophiline D, ANT= protéine transporteur des nucléotides adényliques, VDAC= pore de la membrane externe, CK= créatine kinase, BR= récepteur aux benzodiazépines



**Figure 13**  
**Les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose.**

La voie extrinsèque est mise en jeu à partir de l'activation de récepteurs membranaires, et fait intervenir des médiateurs extracellulaires. C'est la principale voie de transmission de messages apoptotiques entre les cellules. L'activation des récepteurs FAS active la pro-caspase 8 en caspase 8 active. Par la suite la cascade apoptotique se met en place et forme un complexe multimoléculaire appelé Apoptosome. La voie intrinsèque est activée par de nombreuses molécules cytosoliques. Elle active principalement les molécules pro-apoptotiques comme Bax et Bcl-2, qui vont se fixer sur la membrane mitochondriale. Au final, elles favorisent la formation puis l'ouverture du pore mPTP, permettant la sortie du  $Ca^{2+}$ . La perméabilisation des membranes mitochondriales permet la fuite de protéines pro-apoptotiques (Cytochrome c, AIF, Smac-Diablo) vers le cytosol, et vont participer à la poursuite de la cascade apoptotique. A noter que la voie extrinsèque, via l'activation de BID, permet de faire un pont entre les deux voies et d'agir finalement sur le pore mPTP. Cyt C= cytochrome c; mPTP= pore mitochondrial de perméabilité membranaire

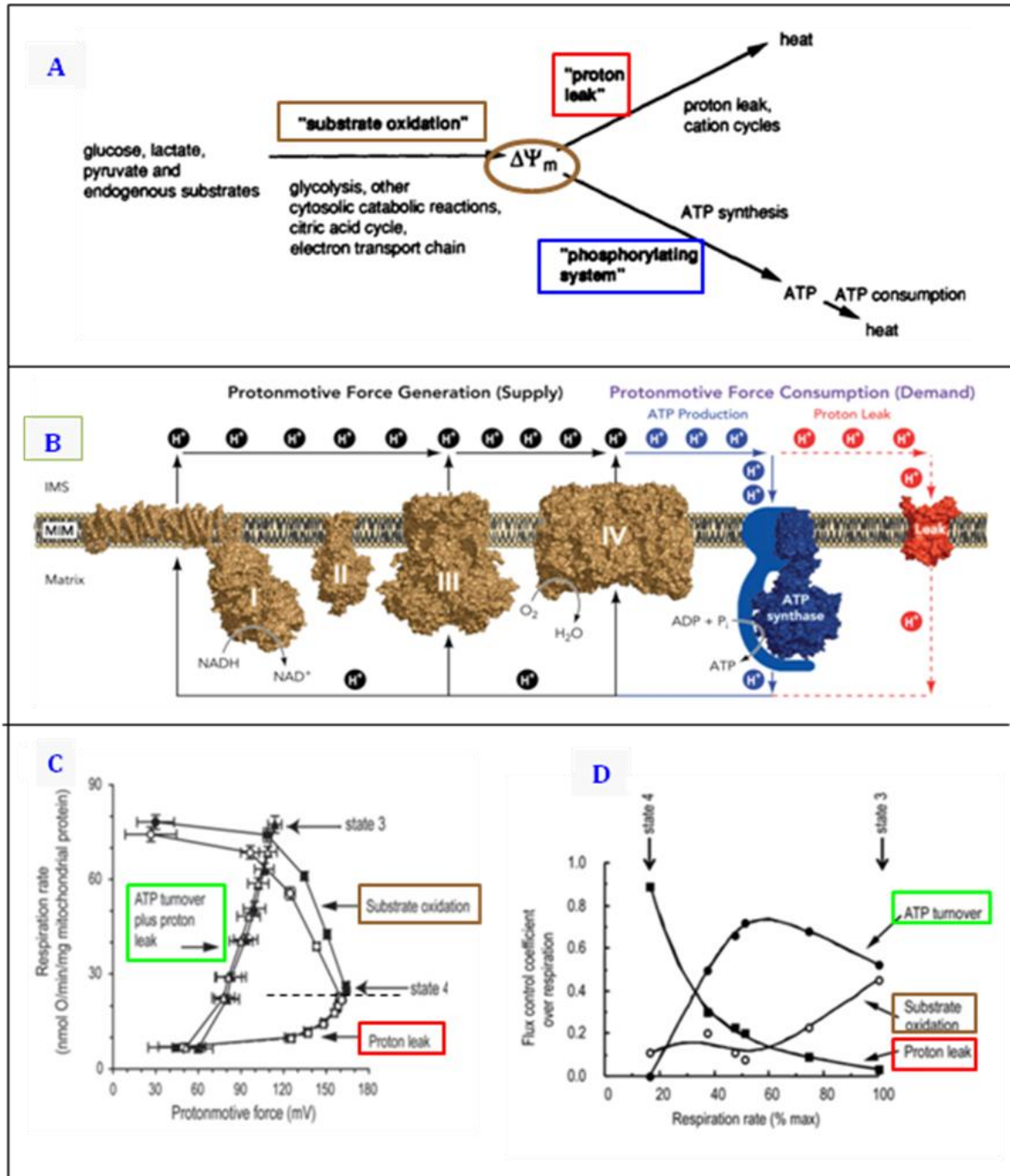


Figure 14

Fonctionnement de la chaîne respiratoire, du pore de perméabilité mitochondriale, et principes d'analyse des explorations de la phosphorylation oxydative (Brand MD, Biochem J 2011; Divakaruni AS, Physiology 2011; Harper ME, J Biol Chem 1993) **A- Représentations schématiques des voies d'entrée et de sorties du gradient de proton mitochondrial** ( $\text{pmf} = \Delta H^+ = \Delta\psi_{\text{ext-int}}$ ). L'oxydation des substrats permet de générer le pmf. Le pmf sert essentiellement à la synthèse d'ATP mais une partie est consommée par d'autres réactions ou dissipée (fuite protonique « proton leak »). **B- Représentation de la chaîne respiratoire et des mouvements de  $H^+$  à travers la membrane interne.** Les  $H^+$  s'accumulent dans l'espace

intermembranaire lors du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire. Les  $H^+$  sont utilisés pour le fonctionnement de l'ATP-synthase, ou la fuite spontanée  $H^+$  à travers la paroi. Ces deux flux sont les seules voies de consommation du pmf. **C et D- Les explorations de la respiration étudient l'utilisation du pmf par la mitochondrie en fonction des substrats (avec ou sans ADP) utilisés.** A gauche (C), les symboles pleins et vides correspondent à deux méthodes différentes. On observe trois courbes: une partie horizontale (« proton leak » rouge) montre qu'en absence de substrat, la pmf n'est pas associée à une consommation d' $O_2$  par la mitochondrie (pas de synthèse d'ATP) mais uniquement à la fuite  $H^+$ . Le maximum de consommation de la pmf pour la fuite  $H^+$  correspond à l'état 4. Lors d'un ajout de substrat (partie « substrat oxidation » en marron et partie «ATP turnover » en vert), la consommation en  $O_2$  augmente. La pmf est alors utilisée essentiellement pour la synthèse d'ATP. Le maximum de consommation d' $O_2$  correspond à l'état 3. A droite (D), les courbes montrent la proportion de la pmf utilisée dans la synthèse d'ATP et dans la fuite  $H^+$ , par rapport à la proportion d' $O_2$  consommée par la mitochondrie (% de la consommation maximale). En absence d' $O_2$ , la pmf ne sert qu'à la fuite  $H^+$ . Lorsque la mitochondrie utilise l' $O_2$  la proportion de la fuite  $H^+$  devient très faible par rapport à l'utilisation de  $H^+$  pour la synthèse d'ATP.  $\Delta H^+ = \Delta \psi = \text{pmf} = \text{force motrice protonique ou gradient de } H^+.$



## 2 -- Objectifs des travaux de recherches au cours du doctorat

Le premier volet cherchait à établir les preuves du rôle de la mitochondrie dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire néonatale et l'impact sur les RI. La première partie a consisté à utiliser la Ciclosporine A comme inhibiteur de la CyP-D intervenant dans l'ouverture de pore de perméabilité mitochondrial. Le rôle de la CsA dans l'activité de la chaîne respiratoire a été étudié conjointement. Nous avons souhaité explorer spécialement le métabolisme mitochondrial à la phase précoce de la reperfusion. Ce travail a fait l'objet d'un premier article publié en 2011 dans la revue *Experimental Neurology*.<sup>344</sup> La deuxième partie de ce travail avait pour but d'évaluer une autre thérapeutique agissant sur la mitochondrie et les RI. Grâce aux données expérimentales de l'ischémie cérébrale adulte, nous avons décidé d'évaluer l'effet du postconditionnement ischémique sur les fonctions mitochondriales et sur les modifications circulatoires précoces. Ce dernier point s'intègre au second volet de ce projet de recherche de doctorat.

Le second volet était de poursuivre les expériences concernant la caractérisation des dysfonctions circulatoires dans l'ischémie cérébrale transitoire néonatale. Nos travaux précédents avaient montré la mise en jeu de la circulation collatérale dans notre modèle expérimental, ainsi que l'impact du DSC résiduel perischémique sur les lésions cérébrales.<sup>35, 345</sup> Nous avons souhaité poursuivre la description de la macrocirculation et de la microcirculation cérébrale, à l'aide de techniques Doppler ultrason, Laser doppler et autoradiographie.

## 3 -- Matériels et méthodes

### 3.1 -- Procédures chirurgicales expérimentales

#### 3.1.1 -- Modèle néonatal d'ischémie-reperfusion

Toute l'expérimentation animale a été réalisée en conformité avec les directives françaises et celles de la communauté européenne, pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire. La procédure chirurgicale est réalisée sur ratons Wistar âgé de 7 jours (17-21 g; Janvier, Le Genest St-Isle, France) sous microscope optique.<sup>33</sup> Les ratons sont anesthésiés par voie respiratoire par l'isoflurane à 1%. Le raton est installé en position dorsale pour permettre la réalisation d'une incision cutanée médiane au niveau du cou afin d'exposer la gauche l'artère carotide commune. Le raton est ensuite placé en position latérale droite pour réaliser une incision de la peau oblique entre l'oreille et l'œil. Après l'excision du muscle temporal, un volet osseux est réalisé au niveau de l'os frontal au dessus de l'arcade zygomatique. Ensuite, l'ACM gauche circulant à la surface corticale est électrocoagulée au niveau d'un croisement visible avec une grosse veine cérébrale. Après cette procédure, un clamp vasculaire (18055-04, Fine Science Tools, Heidelberg, Allemagne) est placé successivement sur chacune des deux artères carotides communes droite et gauche, et marque le début de la phase d'ischémie. Les rats sont ensuite placés dans un incubateur chauffant pour éviter l'hypothermie. Les clamps vasculaires sont retirés après 50 min d'ischémie, sous contrôle du microscope pour éviter de déchirer les vaisseaux. Les incisions cutanées, crâniennes et cervicales, sont ensuite suturées. Au cours de la procédure chirurgicale, la température corporelle est contrôlée de manière non-invasive et discontinuée afin de maintenir la température entre 36-37°C. Après la récupération, les ratons ont été transférés à leurs mères dès leur réveil.

#### 3.1.2 -- Protocole de mesure du volume de l'infarctus

Le volume de l'infarctus est mesuré en utilisant un analyseur d'image (Image-Pro, Paris, France) à partir des coupes histologiques en crésyl violet (14 coupes coronales à 500 µm d'intervalle). Le volume de l'infarctus est exprimé en pourcentage du volume cortical et sous-cortical par rapport au volume total de l'hémisphère gauche. La lésion est principalement présente dans le cortex, la substance blanche sous-corticale et les noyaux gris centraux.

#### 3.1.3 -- Protocole de traitement par la Ciclosporine A

Cent vingt trois animaux ont été affectés de manière aléatoire à l'un des dix groupes suivants: 4 groupes contrôles d'animaux ischémiés (G1, G3, G5 et G9) ayant reçu une injection de solution saline; 2 groupes d'animaux ischémiés ayant reçu de la Ciclosporine A (CsA, Sandimum, Novartis ®, Bâle, Suisse) dans du sérum salé à 0,9% , administrée soit par voie intrapéritonéale (20 mg/kg dans 200µl) à la reperfusion (G2) soit par voie intraveineuse (10 mg/kg dans 100µl) 1h (G4) ou 14h (G6 et G10) avant le début de l'ischémie. Les animaux naïfs ont reçu un volume équivalent de solution saline ou de CsA (G7 et G8). Le taux de mortalité globale était <10% et ne différait pas entre les animaux traités par CsA ou par sérum salé dans toutes les expériences.

### 3.1.4 -- Protocole de Postconditionnement ischémique

Les animaux ont été assignés au hasard à la procédure de postconditionnement ischémique ou aux groupes témoins. Après 50 min d'ischémie, le postconditionnement ischémique a consisté en plusieurs séquences successives de ré-occlusion/reperfusion, soit des deux carotides de manière simultanée ou soit de la carotide gauche seule. Les temps de ré-occlusion étaient de 30 s, 1 min ou 5 min. La durée de reperfusion était identique à la durée d'occlusion. La procédure a été répétée pendant 3 cycles. Dans une autre série d'expériences, le protocole a étudié une reperfusion alternative générée par la libération successive à 5 min d'intervalle des deux carotides (D puis G ou G puis D). Au total, 99 animaux ont été utilisés pour ces expériences.

### 3.1.5 -- Monitoring des paramètres physiologiques sanguins

Les gaz du sang ont été effectués par prélèvement intracardiaque à l'aiguille par voie transthoracique dans le ventricule gauche. Les paramètres de pH,  $paO_2$ ,  $paCO_2$  ont été mesurés grâce à un analyseur de gaz du sang (Ciba-Corning 248), au niveau basal (animaux non opérés, hors anesthésie), avant et après inhalation de gaz (5%  $CO_2$  ou NO). Le monitoring continu de la  $pCO_2$  transcutanée a été réalisé grâce à un moniteur  $pO_2/pCO_2$  (Philips Medical System, IntelliVue MP40 néonatale, Böblingen, Allemagne) avec capteurs cutanés  $pO_2/pCO_2$  (Radiometer Medical ApS, Bronshoj, Danemark).

## 3.2 -- Explorations mitochondriales

### 3.2.1 -- Préparation des mitochondries isolées

Les rats traités par CsA ou par sérum salé (groupes G9 et G10) ont été tués par décapitation à 30-40 min après la reperfusion (2 animaux pour chaque préparation de

mitochondries isolées, pour un total de 6 à 16 animaux). Les cerveaux ont ensuite été rapidement disséqués sur une plaque froide. Les cortex correspondants à la zone à risque dans le territoire vascularisé par l'ACM ont été prélevés chez les animaux opérés et chez des animaux naïfs. Les mitochondries ont été par centrifugation différentielle des homogénats corticales dans une solution contenant 50 mM de tampon Tris (pH 7,4), 70 mM de saccharose, 210 mM de mannitol, 10 mM EGTA, tel que décrit précédemment.<sup>302, 346</sup> La procédure a permis d'obtenir un surnageant (S2) et une fraction mitochondriale (M1). Les mitochondries ont été remises en suspension dans le même milieu sans EGTA et conservées dans la glace. La concentration de protéines cytoplasmiques et mitochondriales a été mesurée par la méthode de Bradford<sup>347</sup> en utilisant le sérum albumine bovine comme standard.

### 3.2.2 -- La microscopie électronique

Les mitochondries des cerveaux des animaux naïfs (n = 3), isolées par la procédure décrite ci-dessus, ont été placées dans un tampon à 0,1 M de Na-cacodylate contenant du glutaraldéhyde à 2% (pH 7,4), puis dans du tétraoxyde d'osmium à 1%. La déshydratation a été effectuée dans une série de bains d'éthanol et d'oxyde de propylène, avant que les échantillons ne soient placés dans l'Epon. Les lames ont été examinées au microscope électronique Jeol 100 CXII électrons.

### 3.2.3 -- Mesure de la capacité de rétention du $\text{Ca}^{2+}$ mitochondrial

Le CRC est défini comme la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  nécessaire pour déclencher l'ouverture mPTP in vitro.<sup>348</sup> La mesure de la CRC a été réalisée à 25°C grâce à un spectrofluorophotomètre (F-2500 de Digi laboratoire, Hitachi) muni d'un agitateur magnétique et sous contrôle thermostatique. Le  $\text{Ca}^{2+}$  libre cytosolique extra-mitochondrial a été mesurée par la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescent ( $\text{Ca}^{2+}$  Green TM-5 N à 1  $\mu\text{M}$ ) émettant des émissions des longueurs d'onde fixée à 500 et 530 nm. Les mitochondries (0,25 mg de protéines) ont été remises ensuite en suspension dans 2 ml de tampon (pH 7,4) contenant 50 mM, KCl 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM de Tris, 150 mM de saccharose et 5 succinate mM. Après une période de préincubation de 1 min, du  $\text{CaCl}_2$  a été administré toutes les minutes dans le milieu extramitochondrial. Une fois ajouté, le  $\text{Ca}^{2+}$  est rapidement absorbé par les mitochondries, ce qui est responsable d'une diminution rapide de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  extra-mitochondrial proche du niveau de référence (Argaud et al. 2004). Après une charge totale suffisante de  $\text{CaCl}_2$ , on observe brutalement une rapide augmentation de la fluorescence dans le milieu extra-mitochondrial indiquant une libération massive de  $\text{Ca}^{2+}$  par les mitochondries en raison de l'ouverture du pore mPTP. Le CRC est exprimé en  $\eta\text{moles}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  par mg de protéines mitochondriales.

### 3.2.4 -- La consommation d'oxygène mitochondriale

La consommation d'oxygène mitochondriale a été mesurée à l'aide d'un Oxygraphe (Oroboros Instrument) à 25°C. Les mitochondries (environ 0,3 mg de protéines) ont été incubées dans 2 ml d'un tampon (pH 7,4) contenant 60 mM de KCl, 150 mM de saccharose, 20 mM de Tris-HCl, 5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 20 mM de glutamate. L'état 3 de la respiration mitochondriale (ADP-dépendant) a été mesuré par l'ajout de 0,2 mM d'ADP. L'état 4 (ADP-indépendant) a été mesuré dans le même milieu sans ajout d'ADP. La consommation d'oxygène par la mitochondrie est exprimée en  $\text{nmol d'O}_2$  par min et par mg de protéine mitochondriale. Le rapport du contrôle respiratoire (RCR) est défini comme le ratio état 3 / état 4 et évalue la qualité du couplage des complexes de la chaîne respiratoire.

### 3.3 -- Analyse histochimique par Western blot

Les protéines mitochondriales et cytosoliques analysés (40  $\mu\text{g}$ ) proviennent des fractions M1 et S2 (cf préparation des mitochondries isolées). Les protéines ont permis la réalisation des Western blot comme décrit précédemment.<sup>46</sup> Les anticorps primaires utilisés dans cette étude étaient des anticorps anti  $\alpha$ -spectrine (FG 6090, Biomol, Coger, Paris, France), CyP-D (AP1035, Calbiochem, Merck Chemicals, Nottingham, Royaume-Uni) et AIF (AB16501, Chemicon, Coger). Un contrôle normalisé de la charge protéique a été inclus sur chaque westernblot en utilisant des anticorps anti  $\beta$ -actine pour les protéines cytosoliques (clone AC-15, Sigma Aldrich) et contre la sous-unité IV de COX-1 pour mitochondriale protéines (clone 20E8, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

### 3.4 -- Explorations radio-isotopiques

#### 3.4.1 -- La mesure quantitative multifocale du DSC.

Le DSC régional a été mesurée chez des rats grâce à une technique quantitative autoradiographique utilisant le  $^{14}\text{C}$ -iodoantipyrine comme traceur diffusible. Le protocole a été adapté de celui de la souris<sup>349, 350</sup> et nécessite l'utilisation d'une pompe à perfusion programmable (Harvard 44) pour la perfusion intraveineuse du traceur. L'anesthésie a été induite par Isoflurane 1,5% par l'intermédiaire d'un masque nasal avec un mélange  $\text{O}_2/\text{N}_2\text{O}$  (25%/75%). L'héparine et traceur radioactif sont administrés à l'aide d'une aiguille de 0,3 mm (30G) reliée à une seringue Hamilton (500  $\mu\text{l}$ ) par un cathéter 20 cm (PE10). Au moment de la mesure, l'aiguille est insérée dans la veine jugulaire externe droite et 16  $\mu\text{l}$  d'héparine (800 UI/kg) est perfusé à l'animal. Puis,

on réalise l'injection de 100 µCi/kg de [<sup>14</sup>C]-iodoantipyrine (ARC, 54 mCi/mmol), dilué dans 140 µl de solution saline à 0,9%, et perfusé sur 35s. A la fin de la perfusion, le sang artériel prélevé à l'aiguille Myjector 300µL (29G) par ponction intracardiaque transthoracique permet de déterminer le pic de la courbe de concentration du traceur. Les rats ont ensuite été immédiatement décapités et leurs têtes ont été rapidement congelées dans l'isopentane refroidi à -45°C (Greenberg et al., 1999). On réalise ensuite des coupes coronales de 20 µm et utilisé soit pour autoradiographie soit pour l'histologie en crésyl violet. La concentration du [<sup>14</sup>C]-iodoantipyrine est mesuré par densitométrie sur les autoradiogrammes (MCID; Imaging Research). Les valeurs absolues des débits sanguins cérébraux (ml/min/100g de tissu cérébral) sont calculés à partir de la concentration locale du traceur accumulé dans le tissu cérébral et de la concentration sanguine du traceur. L'analyse des autoradiogrammes a été réalisée sur un total de 68 régions cérébrales, et les valeurs des DSC on été regroupées pour caractériser la distribution du flux sanguin à différents niveaux caudo-rostraux du cerveau.

### 3.5 -- Explorations des débits et flux sanguins cérébraux

Ce chapitre débutera par une revue rapide de l'utilisation de la technique Doppler ultrason et de la technique par Laser doppler dans l'ischémie-reperfusion cérébrale. Ces deux outils ont pris une place importante dans les travaux menés pour caractériser notre modèle sur le plan de la circulation cérébrale.

La mesure du DSC est un objectif complexe qui nécessite souvent des techniques lourdes ou invasives. La méthode de référence de la mesure du DSC reste la technique de dilution selon le principe de Fick: la vitesse de décroissance d'un traceur dans le sang est proportionnelle au débit sanguin. Les premiers travaux de mesures datent des années 1940 grâce à un traceur inerte N<sub>2</sub>O.<sup>142, 143</sup> Les techniques ultérieures ont utilisés des techniques autoradiographiques par [<sup>14</sup>C]-iodoantipyrine permettant une mesure précise du DSC global associé à une cartographie cérébrale.<sup>351</sup> Elles restent souvent difficilement réalisables en pratique clinique et coûteuses en laboratoire. Les techniques modernes, de type imagerie par résonance magnétique avec images de perfusion sont de plus en plus utilisées. Mais les techniques de monitoring non invasif sont en plein essor. Ceci est l'objet de ce chapitre.

#### 3.5.1 -- Le Doppler ultrasons

Dans le domaine neurovasculaire Le Doppler ultrasons acquiert une importante légitimité du fait de son caractère non invasif, de sa facilité d'accès, de réalisation et surtout des informations dynamiques obtenues en temps réel.<sup>352</sup> La technique utilise le principe doppler. Un émetteur envoyé un signal ultrasonique à travers la paroi d'un organe. Un récepteur et un

transducteur permettent le recueil et l'analyse du signal émis en retour. Le doppler analyse les éléments en mouvements dans le tissu, c'est-à-dire le mouvement des globules rouges intravasculaires. L'appareil mesure un profil de vitesses des globules rouges dans un vaisseau. En neuroimagerie, le Doppler ultrasons évalue ainsi la perfusion dans les artères cérébrales du polygone de Willis. Il mesure les vitesses sanguines au cours du cycle cardiaque: vitesses systoliques (Vs), diastoliques (Vd) et moyennes (Vm). Les profils des vitesses au cours du temps sont appelés spectre doppler. La vitesse systolique tend à refléter les résistances vasculaires proximales, alors que la vitesse diastolique reflète les résistances vasculaires périphériques de la microcirculation. A partir des mesures des vitesses systoliques et diastoliques, il est possible de calculer la vitesse artérielle moyenne (Vm). La Vm représente l'aire sous la courbe spectrale, et est proportionnelle au DSC circulant dans l'artère. Cependant Il n'est pas possible de mesurer le DSC total en absence d'une mesure de la surface de section du vaisseau. De plus, l'interprétation du DSC circulant dans une artère est assujettie au rayon de cette artère, principal déterminant des RVC. Néanmoins, plusieurs auteurs ont montré que le diamètre des artères cérébrales variait peu sur une courte période de temps, même pour des variations importantes de pression artérielle.<sup>353</sup>  
<sup>354</sup> Ceci a pour conséquence que les Vm mesurées par doppler sont bien corrélées au débit sanguin dans l'artère.<sup>138</sup>

Le doppler permet d'évaluer la circulation sanguine cérébrale par plusieurs approches, complémentaires et intégratives. Premièrement il permet le monitoring du DSC au cours du temps pour suivre l'évolution des processus pathologique ou les thérapeutiques mises en place. Ensuite, il caractérise l'ARC par les variations du DSC en fonctions du niveau de pression artérielles systémiques. L'approche "statique" fait appel à des tests dynamiques agissant sur le niveau de la pression artérielle (compressions carotidienne, posturales, injections médicamenteuses, oscillations spontanées).<sup>352</sup> L'approche "dynamique" fait appel aux variations spontanées de la pression artérielle. Le Doppler peut également mesurer la vasoréactivité cérébrale, c'est à dire la réserve de vasoconstriction et de vasodilatation des artères cérébrales. Cette approche est essentiellement effectuée par modifications du CO<sub>2</sub> artériel.<sup>128</sup> Enfin, il peut évaluer l'intégrité du CNV (adéquation du DSC par rapport aux besoins métaboliques). Cette approche nécessite de pouvoir mesurer le DSC en même temps que l'activité métabolique (consommation cérébrale en O<sub>2</sub> ou glucose) induite par stimulation directe (électrodes de stimulation intraparenchymateuses) ou stimulation indirecte (électrodes périphériques).

### Méthodologie expérimentale

Le doppler ultrasons (Vivid 7, General Electric Medical Systems Ultrasound, Horten, Norway) utilise une sonde linéaire de 12 MHz (Bonnin JNM 2011). Les animaux sont préalablement anesthésiés. L'interface utilise un masque nasal (Isoflurane 0,5% dans un mélange 1/3 O<sub>2</sub> et 2/3 N<sub>2</sub>O). La température est contrôlée grâce à un tapis chauffant à 37°. Les fréquences cardiaques, Vs, Vd, Vm sont enregistrées en continue. Les mesures sont réalisées au niveau des

deux carotides internes et du TB: au niveau basal (pré-ischémique), après électrocoagulation de l'ACM, après clampage des deux carotides, pendant l'ischémie (M40), et pendant les 15 premières minutes de la reperfusion.

### 3.5.2 -- Laser Doppler et Laser imageur tissulaire

Le Laser doppler est la technique de référence pour le monitoring de la microcirculation et du flux sanguin tissulaire (FST). Elle utilise un signal laser grâce à une fibre optique positionnée à la surface du tissu. Le signal laser est réfléchi par les globules rouges en mouvement, présents dans la zone d'étude. Le signal est ensuite renvoyé avec une longueur d'onde différente du signal d'origine et recueilli par des photorécepteurs. L'appareil interprète ce signal en fonction de la fréquence du signal réceptionné. Le résultat de ce signal est corrélé à l'intensité du FST qui correspond à la perfusion tissulaire, reflet de la microcirculation. La zone étudiée par le laser doppler est en moyenne de 1 mm. Le Laser doppler ne peut donc évaluer que la perfusion tissulaire superficielle de l'organe. Cette technique a l'avantage d'être non invasive et d'enregistrer en continu le FST.<sup>355</sup> Cependant, la surface d'analyse est restreinte et difficilement extrapolable à l'ensemble de l'organe. Certains éléments peuvent altérer la qualité du signal, comme une lumière externe, la pression du capteur à la surface de l'organe, la température ou l'utilisation de drogues vasoactives.

Le Laser doppler imageur de perfusion (« laser speckle perfusion imaging») est une évolution technologique du Laser doppler. La technique a été élaborée par Fercherb et Briers dans les années 1990.<sup>356</sup> Les valeurs obtenues au niveau de la perfusion cérébrale montrent une corrélation quasi parfaite avec les valeurs obtenues par Laser doppler<sup>357</sup> avec lequel il partage les mêmes principes physiques. Elle utilise deux types d'information à partir du signal recueilli : la composante temporelle et la composante spatiale du FST. L'association des deux donne ainsi accès à une cartographie dynamique (en temps réelle et en 2D) de la perfusion tissulaire. Cet élément est un avantage considérable par rapport au Laser doppler conventionnel. Néanmoins, le LDP conserve une résolution spatiale médiocre. Il permet de monitorer la perfusion cérébrale chez le petit animal sans avoir besoin de réaliser une effraction de la boîte crânienne.<sup>357</sup>

Le LDP a été évalué dans plusieurs modèles animaux, en particulier dans une étude concernant la perfusion rétinienne et cutanée. Concernant la perfusion cérébrale, et spécialement dans l'ischémie, Ayata et coll. ont pu montrer dans un modèle d'ischémie focale chez la souris, que le Laser de perfusion pouvait évaluer la qualité de la VRCO<sub>2</sub>, ARC et CNV.<sup>358</sup> De plus, la représentation en 2D de la perfusion cérébrale superficielle permettait de visualiser la cartographie du cœur, de la pénombre et des zones saines. La perfusion cérébrale par LDP était bien corrélée à une mesure de référence du DSC par méthode autoradiographique au [<sup>14</sup>C]-



iodoamphétamine.<sup>358</sup> Il permet aussi l'évaluation de la perfusion tissulaire à long terme grâce à sa moindre invasivité.<sup>359</sup> L'utilisation du LDP dans un modèle d'H-I chez le rat et la souris nouveaux a objectivé la réduction de la perfusion tissulaire corticale pendant l'ischémie; à la reperfusion la restauration du FST était lente et progressive sur les 24 premières heures.<sup>360</sup> La profondeur de la phase d'hypoperfusion était corrélée à la sévérité des lésions histologiques. Les auteurs concluaient que cette technique semblait particulièrement intéressante et adaptée à l'ischémie cérébrale chez le petit animal.

### Méthodologies expérimentales

Le Laser doppler a été utilisé chez des animaux préalablement anesthésiés par Isoflurane 0,5%. La température corporelle est enregistrée de manière discontinue et de manière non invasive. La thermorégulation est réalisée par un tapis chauffant à 37°C. Le Laser doppler fluxmétrie (Moor Instruments Ltd, Axminster, UK) utilise une sonde de type MP7b.<sup>35, 345</sup> La sonde est positionnée sur le crâne à environ 2mm en postérieur et 3mm en latéral par rapport au Bregma, après avoir réalisé une incision cutanée. Les valeurs du FST sont recueillies par 3 à 5 mesures successives et sur une période de 5 min dans 3 régions d'intérêts de la pénombre: au niveau basal (pré-ischémique), après électrocoagulation de l'ACM, après clampage des deux carotides, et durant les 20 premières minutes de la reperfusion. Les valeurs mesurées sont ensuite normalisées par rapport au niveau basal de référence.

Le Laser doppler de perfusion (Moor FLPI, Moor instruments Ltd, Axminster, UK) est utilisé dans les mêmes conditions d'anesthésie et de thermorégulation que précédemment. Les rats sont mis en position ventrale. La peau est incisée afin d'obtenir une large ouverture cutanée dans la région temporo-pariétale. Les images sont enregistrées en continue à la fréquence de 1 hertz (avec 4 ms d'exposition), en mode haute définition (760 x 568 pixels): au niveau basal, après électrocoagulation de l'ACM, après clampage des deux carotides, au cours des 30 premières minutes de la reperfusion. Un second enregistrement est réalisé à 24 heures de la reperfusion. Les cartographies en couleurs du cortex cérébral (palette 16 couleurs) permettent de redessiner 6 régions d'intérêts dans la pénombre (50 x 50 pixels). Ces régions d'intérêts permettent d'obtenir les valeurs du FST (en unité arbitraire). Les modifications du FST sont comparées par rapport au niveau basal pré-ischémique de référence.

## 4 -- Résumés et articles de la thèse

### 4.1 -- Article 1 : Evaluation de la Ciclosporine A dans un modèle d'ischémie cérébrale focale transitoire chez le raton P7

#### Introduction

La mitochondrie est impliquée dans les processus ischémiques en particulier par l'intermédiaire du pore de transition membranaire mPTP<sup>277, 278</sup>. Au cours de l'ischémie et à la reperfusion, la libération de molécules pro-apoptotiques fait suite à l'activation des processus d'excitotoxicité.<sup>312</sup> La synthèse de radicaux libres associée au déséquilibre électrochimique des potentiels membranaires de la mitochondrie favorise l'ouverture du pore mPTP. Comme pour l'ischémie cérébrale de l'adulte<sup>286</sup> le pore mPTP semble aussi intervenir chez le jeune.<sup>361</sup> Le rôle de la CyP-D dans la constitution du pore mPTP reste débattu.<sup>302</sup> La CsA forme un complexe protéique avec la CyP-D dont elle inhibe les effets inducteurs sur l'ouverture du pore mPTP. A ce jour, les seules expérimentations de la CsA chez le nouveau-né concernent un modèle d'H-I.<sup>341, 343</sup>

L'objectif de cet article a été d'évaluer l'effet de la CsA sur le volume lésionnel, l'impact de la CsA sur la capacité de recapture du  $\text{Ca}^{2+}$ , sur la respiration mitochondriale, sur l'inflammation cellulaire et l'apoptose au cours de la reperfusion précoce, dans un modèle d'ischémie cérébrale focale néonatal chez le rat.

#### Matériels et méthodes

Le modèle expérimental est un modèle d'ischémie-reperfusion chez un raton P7, par électrocoagulation de l'ACM gauche associé à un clampage bicarotidien transitoire pendant 50mn.<sup>35</sup> La CsA a été administrée soit par voie intrapéritonéale en post-traitement immédiat à la reperfusion (20 mg/kg), soit par voie intraveineuse en pré-traitement (10 mg/kg) 1 h ou 14 h avant l'ischémie. Les débits sanguins cérébraux pendant l'ischémie et la reperfusion ont été mesurés par doppler ultrasons. Les volumes lésionnels ont été mesurés à 48 h sur les coupes en crésyl violet grâce à un analyseur d'images. Un score lésionnel a été également attribué visuellement lors du sacrifice des animaux en fonction de l'étendue de l'infarctus corticale: score 1=lésion légère, score 2= lésion modérée, score 3= lésion sévère. A partir des coupes histologiques, on a réalisé des immunomarquages pour les polynucléaires neutrophiles par anticorps anti-myéloperoxydase, de la microglie par anticorps anti-tomatolectine. Les mastocytes ont été colorés au bleu de toluidine. L'apoptose a été mesurée par méthode TUNEL (ADN fragmenté et corps apoptotiques) et par

Western-Blot dirigés contre l' $\alpha$ -spectrine dans le cytosol, contre AIF, CyP-D, CoX1 dans la mitochondrie. L'évaluation de la capacité de rétention du  $\text{Ca}^{2+}$  par la mitochondrie a été réalisée par fluorospectrophotométrie à l'aide d'un traceur calcique fluorescent, sur les mitochondries prélevées 30-40 min après le début de la reperfusion. Enfin, la qualité de la respiration mitochondriale a été mesurée par la consommation d'oxygène en présence ou non d'ADP (état 3, état 4). Le RCR a été calculé à partir de l'état 3 et de l'état 4.

## Résultats

### *Effets de la Ciclosporine A sur les lésions ischémiques*

La CsA n'a pas réduit pas de manière significative le volume des lésions cérébrales chez les animaux traités par rapport aux animaux non traités, lorsqu'elle a été administrée en prétraitement 1h (volume moyen  $16,4\% \pm 7,5$  vs  $19,2\% \pm 8,1$ ) ou 14h avant l'ischémie ( $11,4\% \pm 3,3$  vs  $11,4\% \pm 9,2$ ) ni en post-traitement immédiat ( $12,3\% \pm 6,2$  vs  $12,2\% \pm 5,6$ ). Concernant les animaux présentant un score lésionnel de 1 (lésions légères), on note toutefois une tendance à la réduction du volume des lésions chez les animaux traités ( $6,5\% \pm 2,5$  vs  $9\% \pm 3,6$ ;  $p=0,068$ ). Cette tendance n'est pas retrouvée pour les scores 2 (lésions modérées) et 3 (lésions sévères).

### *Effets de la CsA sur l'inflammation et l'apoptose*

Le marquage TUNEL à 48 h retrouve une diminution significative du pourcentage de cellules TUNEL (+) chez les animaux traités par la CsA 14 h avant l'ischémie, par rapport aux animaux non traités ( $49,2\% \pm 10,8$  vs  $76,8\% \pm 11,2$ ;  $p < 0,001$ ). On note également une réduction de 70% du pourcentage des corps apoptotiques suggérant un décalage des processus apoptotiques. L'analyse en Western-Blot des protéines apoptotiques cytosoliques et mitochondriales montre que la CsA réduit le clivage de l' $\alpha$ -spectrine dans le cytosol et la libération d'AIF et COX1 par la mitochondrie 40 min après la reperfusion. Concernant le marquage des cellules inflammatoires, on note à 48 h une réduction chez les animaux traités du nombre de polynucléaires observés par unité de section au niveau de la pie mère ( $14,2 \pm 1,9$  vs  $65,3 \pm 19,9$ ;  $p < 0,001$ ) et du nombre de cellules microgliales périlésionnelles ( $20 \pm 2,4$  vs  $34,1 \pm 5,5$ ;  $p < 0,05$ ). Le pourcentage de mastocytes dégranulants est diminué au niveau de la pie mère ( $24,7\% \pm 7$  vs  $35\% \pm 6$ ;  $p < 0,05$ ). Mais seule la CsA administrée en prétraitement 14 h avant l'ischémie permet de réduire l'inflammation, la dégranulation des mastocytes et l'activation des voies apoptotiques dans notre modèle d'ischémie cérébrale focale chez le raton P7.

### *Effets de la CsA sur le pore mPTP et sur la respiration mitochondriale*

La capacité de rétention du  $\text{Ca}^{2+}$  (CRC) est diminuée chez les animaux ischémiés par rapport aux animaux naïfs ( $50,2 \pm 19,9$  vs  $75,7 \pm 22,6$   $\eta\text{mol/mg}$  de protéines). La respiration

mitochondriale est modérément altérée au cours de l'ischémie, avec une diminution de l'état 3 ( $14,36 \pm 3,42$  vs  $18,74 \pm 3,74$   $\eta\text{molO}_2/\text{min}/\text{mg}$  de protéines;  $p < 0,01$ ) et du RCR ( $4,31 \pm 1,27$  vs  $5,66 \pm 1,41$   $\eta\text{molO}_2/\text{min}/\text{mg}$  de protéines;  $p < 0,01$ ) sans modification de l'état 4.

La CsA 14 h avant l'ischémie augmente la capacité de rétention du  $\text{Ca}^{2+}$  par rapport à l'ischémie seule ( $78,4 \pm 19,2$   $\eta\text{mol}/\text{mg}$  de protéines;  $p < 0,05$ ), améliore le RCR ( $5,64 \pm 1,22$ ) grâce à une diminution de l'état 4 ( $2,72 \pm 0,83$  vs  $3,46 \pm 0,75$ ;  $p < 0,05$ ). Enfin, le Western-Blot confirme la persistance de CyP-D en quantité importante au sein des mitochondries.

## Conclusion

Cette étude démontre l'effet bénéfique de la CsA, administrée en prétraitement 14 h avant l'ischémie, sur l'inflammation cérébrale, sur la réduction de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles, sur la réduction de la dégranulation des mastocytes, sur la réduction des processus apoptotiques, mais uniquement chez les animaux présentant de faibles volumes lésionnels. L'ischémie favorise l'ouverture du pore mPTP précocement à la reperfusion. La CsA améliore la capacité de rétention du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial (retard à l'ouverture du pore mPTP) par un probable mécanisme CyP-D-dépendant. La CsA améliore également le couplage de la chaîne respiratoire probablement par un meilleur équilibre électrochimique mitochondrial.

Ces travaux mettent en évidence le rôle central de la mitochondrie dans l'ischémie cérébrale du jeune, et ouvrent la voie à de nouvelles thérapeutiques neuroprotectrices ciblant spécifiquement la mitochondrie.



## Article 2 : Le postconditionnement ischémique dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire néonatale

### Introduction

Depuis vingt ans, les travaux expérimentaux et cliniques cherchant à tester de nouvelles thérapeutiques neuroprotectrices dans l'ischémie néonatale ont connu peu de succès. Dans les modèles d'ischémie adulte, le postconditionnement ischémique a montré qu'il pouvait réduire les volumes des lésions.<sup>184, 362, 363</sup> Les données montrent que le mécanisme principal du PCi semble être la réduction de l'hyperhémie précoce de reperfusion<sup>184, 331</sup>

Nous avons expérimenté plusieurs protocoles de PCi dans notre modèle d'ischémie cérébrale focale néonatale. L'objectif était de prouver l'effet protecteur du PCi chez le jeune, de déterminer les protocoles les plus efficaces, et les mécanismes impliqués.

### Matériels et Méthodes

Notre modèle expérimental est un modèle d'ischémie-reperfusion cérébrale chez le raton P7, comme précédemment décrit.<sup>33, 35</sup> Nous avons évalué plusieurs protocoles de PCi : 1) PCi réalisé sur les deux carotides simultanément, immédiatement à la reperfusion, par 3 cycles de ré-occlusion/reperfusion de 30 s, 1 min et 5 min; 2) une reperfusion graduelle consistant en un déclampage successif de chaque carotide à 5 min d'intervalle, soit débutant par la droite puis la gauche (R/L), soit la gauche puis la droite (L/R).

La macrocirculation cérébrale a été monitorée par Doppler ultrasons (Vivid7, General Electric Medical Systems ultrasound) sur la carotide droite, la carotide gauche et le tronc basilaire. La microcirculation cérébrale a été évaluée par la qualité de la perfusion tissulaire enregistrée par Laser doppler de perfusion (Moor Instruments Ltd). Ces techniques ont mesuré les débits sanguins cérébraux (DSC) sur les gros vaisseaux et les flux sanguins tissulaires (FST) durant l'ischémie et pendant la phase initiale de la reperfusion (0 à 20 min).

La vasoréactivité cérébrale au CO<sub>2</sub> est la méthode de référence pour l'évaluation de l'intégrité des fonctions endothéliales. La vasoréactivité a été explorée à l'aide d'une épreuve d'inhalation de CO<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub>/ 95% N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Nous avons complété par une épreuve d'inhalation de NO (mélange O<sub>2</sub> 21% / NO 20 ppm), d'après de précédents résultats.<sup>236, 364</sup> Les paramètres physiologiques (pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>) ont été recueillis par ponction intracardiaque (avant et après l'ischémie) associé à un monitoring non invasive des pCO<sub>2</sub>/pO<sub>2</sub> transcutanées (moniteur

IntelliVue MP40, Philips) chez les animaux sains afin de valider la technique chez le raton P7. Les débits sanguins cérébraux ont été mesurés par Doppler ultrasons.

Les volumes des lésions ont été mesurés à 48 h sur les coupes histologiques en crésyl violet grâce à un analyseur d'image (Image-Pro). Ces valeurs ont été rapportées au volume total de l'hémisphère gauche (en %).

## Résultats

### *Résultats de l'efficacité du PCi sur la réduction des volumes lésionnels*

Dans notre modèle d'ischémie cérébrale focale néonatale, quelque soit le protocole de PCi qui a été employé, les volumes des lésions n'ont pas été significativement réduites pour le groupe PCi 1 min ( $13,5\% \pm 6,3$ ,  $n=16$ ), PCi 5 min ( $10,8\% \pm 5,1$ ,  $n=12$ ), PCi 30 s ( $11,6\% \pm 9,2$ ,  $n=11$ ), reperfusion graduelle L/R ( $11,5\% \pm 3,3$ ,  $n=12$ ) ou R/L ( $10\% \pm 4,3$ ,  $n=11$ ) par rapport au groupe contrôle ( $12,8\% \pm 7,2$ ,  $n=15$ ).

Le PCi est inefficace pour réduire la taille de l'infarctus cérébral chez le jeune.

### *Evaluation de la reperfusion cérébrale précoce*

Chez les animaux ischémiés, les Vm mesurées dans la carotide gauche par Doppler ultrasons montrent une récupération partielle du DSC à 1min et à 15 min par rapport au niveau basal (respectivement  $63\% \pm 40$  et  $72\% \pm 21$ ). Les valeurs mesurées dans la carotide droite sont comparables (données non publiées) alors que les valeurs dans le TB ne sont pas significativement différentes ( $127\% \pm 32$ , NS par rapport au basal).

Au niveau de l'hémisphère gauche le FST est de  $30\% \pm 11$  au déclampage puis augmente régulièrement jusqu'à  $44\% \pm 9$  à 20 min. Le FST ne récupère donc que partiellement au cours de la phase précoce de la reperfusion.

A la différence des données publiées dans l'ischémie cérébrale focale adulte, aucune hyperhémie n'a été observée dans notre modèle néonatal au cours de la phase initiale de la reperfusion, aussi bien au niveau macrocirculatoire qu'au niveau microcirculatoire.

### *Vasoréactivité et microcirculation cérébrale*

Afin de comprendre les mécanismes qui expliquent ce phénomène original qui est l'absence d'hyperhémie précoce à la reperfusion chez le jeune, nous avons souhaité étudier la  $VR_{CO_2}$  de la microcirculation cérébrale. Chez les animaux sains, nous avons observé une augmentation de la  $pCO_2$  sanguine (Gaz du sang) après inhalation d'un mélange à 5%  $CO_2$  ( $50 \pm 7,5$  à  $77,5 \pm 6,9$  mmHg). Les mesures des  $pCO_2$  transcutanées ont retrouvé une des valeurs et une cinétique comparables ( $60,5 \pm 6$  à  $73,2 \pm 6,7$  mmHg).

De manière surprenante, nous avons mis en évidence une diminution « paradoxale » des DSC mesurés au niveau des artères cérébrales (TB, carotides D et carotide G) sous l'effet du CO<sub>2</sub> chez les animaux naïfs (respectivement de 17%, 22% et 30%) et chez les animaux ischémiés (respectivement 14%, 23% et 20%) par rapport au niveau basal. Après arrêt du CO<sub>2</sub>, les valeurs revenaient au niveau basal (différences non significatives). Les hypothèses concernant cette « vasoconstriction paradoxale » par le CO<sub>2</sub> reste mal comprise. Elle pourrait être due aux niveaux élevés de pCO<sub>2</sub> et aux conséquences systémiques induites par une diminution du débit cardiaque (fréquence cardiaque réduite de 10-30% en dehors de toute hypothermie). Néanmoins, ces résultats atypiques ne nous permettent pas d'interpréter cette épreuve avec fiabilité sur le plan des fonctions endothéliales. Enfin, nous avons évalué la vasoréactivité au NO (effet vasodilatateur). L'inhalation d'un mélange O<sub>2</sub> / NO à 20 ppm ne modifie pas significativement les valeurs des Vm pendant la reperfusion précoce (entre 1 min et 15 min).

Ces résultats traduisent l'absence de vasoréactivité de la microcirculation cérébrale au cours de la reperfusion.

## Conclusion

Nos résultats montrent que le PCi n'est pas une stratégie neuroprotectrice efficace dans l'ischémie cérébrale focale néonatale. La principale explication est liée à l'absence d'hyperhémie à la reperfusion dans notre modèle. La diminution de la perfusion tissulaire mise en évidence pendant la reperfusion est probablement en rapport avec des anomalies de la microcirculation cérébrale, se traduisant par une altération de la vasoréactivité cérébrale, NO-indépendante.





## Article 3: Imagerie dynamique de la reperfusion précoce dans un modèle d'ischémie cérébrale néonatal

### Introduction

La reperfusion a pour conséquences la restauration du flux sanguin dans les artères cérébrales occluses et la réoxygénation des territoires d'aval.<sup>225, 365</sup> La reperfusion apporte les substrats énergétiques dont les cellules cérébrales ont été privées. Cependant, cet afflux sanguin brutal est responsable de lésions induites par la reperfusion (RI).<sup>366</sup> De manière surprenante, la reperfusion à la phase précoce dans notre modèle est progressive, sans hyperhémie.

L'objectif principal de cette étude était de préciser la cinétique de la reperfusion et de caractériser la redistribution du flux sanguin en fonction des régions cérébrales. Le second objectif était d'évaluer la qualité de la phosphorylation oxydative pendant l'ischémie et à la reperfusion.

### Matériels et Méthodes

Le modèle d'ischémie cérébrale focale transitoire néonatal chez le raton à P7 a été utilisé pour les expérimentations (modèle Renolleau modifié<sup>367</sup>). Les vitesses sanguines ont été mesurées dans les carotides et le TB par Doppler ultrasons (Vivid7, General Electrical). La perfusion tissulaire cérébrale a été enregistrée en continue grâce au Laser doppler de perfusion (Laser speckle contrast imaging FLPI V3.0, Moor Instruments Ltd). Le DSC a été quantifié en autoradiographie par traceur diffusible [<sup>14</sup>C]-iodoantipyrine, grâce à un protocole adapté de la souris.<sup>350</sup> L'analyse des autoradiogrammes a porté sur 68 territoires cérébraux, regroupées ensuite en 5 régions principales. Les DSCr ont été quantifiés au niveau basal, perischémique, et à 15 min de reperfusion. La consommation d'O<sub>2</sub> par la chaîne respiratoire a été mesurée sur les mitochondries isolées pendant l'ischémie et à 15 min de reperfusion (état 3, état 4, RCR).

### Résultats

#### *Reperfusion microcirculatoire, redistributions régionales du DSC*

La principale caractéristique de la reperfusion dans ce modèle d'ischémie focale néonatale est l'absence d'hyperhémie à la phase précoce de la reperfusion, remplacée par une reperfusion progressive. Dans la carotide gauche, les Vm représentaient 63% ± 40 de leur valeur basale à 1 min puis 76% ± 21 à 10 min de reperfusion. Dans la carotide droite, les Vm étaient significativement diminuées par rapport à celle de la carotide gauche, soit 20% ± 11 à 1 min et 50

%  $\pm$  33 à 15 min ( $p < 0,001$ ). Dans le TB il n'y avait pas de différence entre la reperfusion et le niveau basal ( $127\% \pm 32$  vs  $100\%$ ,  $p = \text{ns}$ ).

Le LDP retrouvait une augmentation progressive du FST dans la pénombre, passant de  $30\% \pm 11$  à 1 min à  $44\% \pm 9$  à 20 min de reperfusion dans l'hémisphère gauche; dans l'hémisphère droit la cinétique était identique, le FST passant de  $35\% \pm 12$  à 1 min à  $48\% \pm 8$  à 20 min ( $p = \text{ns}$  vs hémisphère gauche).

Les résultats des mesures des débits sanguins cérébraux régionaux (DSCr) par autoradiographie sont multiples. Au niveau basal, on observait une augmentation des DSCr des régions caudales (moelle, pont, cervelet) vers les régions rostrales (cortex pariétal) avec respectivement  $129 \pm 13$  et  $78 \pm 3$  ml/min/100g de tissu cérébral. Au cours de l'ischémie, les DSCr s'effondraient de manière prédominante dans le cortex pariétale gauche ( $19 \pm 2$ ), le cortex frontal ( $6 \pm 0,3$ ), le cortex occipitale et les noyaux gris centraux ( $34-38 \pm 4$  ml/min/100g). Les DSCr augmentaient uniquement dans les régions caudales ( $148 \pm 21$  ml/min/100g). Dans l'hémisphère droit les profils observés étaient identiques ( $p = \text{ns}$  vs hémisphère gauche). Au cours de la reperfusion, les DSCr restaient fortement diminués dans le cortex pariétal et frontal gauches ( $18 \pm 2$  et  $19 \pm 3$  ml/min/100g), alors qu'à droite les DSCr augmentaient davantage (respectivement  $30 \pm 5$  et  $38 \pm 6$  ml/min/100g;  $p < 0,05$  vs hémisphère gauche). A noter une hyperhémie présente uniquement dans les régions caudales ( $161 \pm 15$  ml/min/100g). Par ailleurs, la cinétique de la reperfusion s'effectuait simultanément dans les 3 dimensions de l'espace pour les 2 hémisphères, selon un gradient caudo-rostral, médio-latéral et ventro-dorsal. Pour la première fois, ces résultats nous permettent de mieux comprendre la dynamique de reperfusion dans ce modèle.

#### *Anomalies du fonctionnement de la chaîne respiratoire*

L'exploration de la chaîne respiratoire a mis en évidence une dysfonction marquée de la phosphorylation oxydative au cours de l'ischémie, avec une réduction de 50% de l'état 3 et 43% du RCR dans l'hémisphère gauche et respectivement 45% et 35% dans l'hémisphère droite, par rapport au niveau basal. A 15 min de la reperfusion, la récupération était supérieure dans l'hémisphère droit par rapport au gauche (état 3 = 81% et RCR = 82% vs état 3 et RCR = 63%). La récupération de la phosphorylation oxydative n'était que partielle dans l'hémisphère gauche.

#### *Conclusion*

Dans l'ischémie cérébrale focale néonatale, les reperfusions macrocirculatoire et microcirculatoire sont graduelles (sans hyperhémie). Elles évoluent parallèlement à la restauration de la phosphorylation oxydative. La perfusion tissulaire superficielle du territoire ischémié s'effectue selon un processus centripète, par reperfusion rétrograde à partir des collatérales périlésionnelles perfusées par l'ACA principalement.<sup>54</sup> Les DSCr dans les territoires profonds

mettent en évidence que un processus selon des gradients caudo-rostral, ventro-dorsal et médio-latéral. De plus, la reperfusion des hémisphères est interdépendante grâce à la collatéralité. La qualité de la reperfusion joue un rôle dans les processus lésionnels cérébraux. L'absence de récupération rapide de la chaîne respiratoire (hémisphère gauche vs droit) est probablement un élément majeur dans la constitution des lésions cérébrales (RI).



## 5 -- Discussion

### 5.1 -- Discussion à propos de l'article 1

L'article sur l'évaluation de la Ciclosporine A dans un modèle d'ischémie-reperfusion néonatal a mis en évidence 4 points principaux: 1) la CsA tend à réduire le volume des lésions cérébrales légères, pas des lésions cérébrales modérées à sévères, 2) l'ischémie cérébrale agit sur l'ouverture du pore mPTP pendant la reperfusion, 3) la CsA inhibe l'ouverture du pore mPTP uniquement en prétraitement intraveineux (10mg/kg) 14 heures avant l'ischémie, et 4) la CsA améliore la respiration mitochondriale. Cette étude s'intègre dans l'objectif général de la thèse: comprendre le rôle de la mitochondrie dans l'ischémie cérébrale transitoire focale du nouveau-né et sa place dans les mécanismes lésionnels induits par la reperfusion. Nous allons discuter séparément ces différents points.

#### *La CsA réduit le volume des lésions cérébrales légères*

Parmi les protocoles testés dans cette étude, seul le prétraitement i.v. 14h avant l'ischémie montre une tendance à la réduction de volume pour les lésions légères. La CsA administrée en intrapéritonéale (20mg/kg) immédiatement à la reperfusion ou en intraveineux 1h avant l'ischémie (10mg/kg) ne montrent aucun effet neuroprotecteur. Ces résultats s'opposent à ceux observés dans l'ischémie focale adulte. Plusieurs études ont mis en évidence un effet neuroprotecteur sur la réduction du volume lésionnel.<sup>282, 284, 285</sup> Cependant, la voie d'injection, la dose, le timing optimal ainsi que l'association à des techniques de perméabilisation de la BHE restent encore mal définis.<sup>368</sup> Les principales études montrent un effet de la CsA immédiatement à la reperfusion.<sup>282, 283, 286, 342, 369</sup> Après une occlusion de 2h de l'ACM, la CsA (10mg/kg) administrée 5min après la reperfusion de l'artère carotide montre un effet neuroprotecteur majeur avec une réduction de 90% du volume lésionnel.<sup>369</sup> L'efficacité de la CsA diminue si l'injection est réalisée plus tard, mais elle peut encore être faite jusqu'à 6h post reperfusion. Matsumoto et al. notent également que l'effet neuroprotecteur maximal est obtenu par 2 injections de CsA (0h-24h, 20mg/kg) débutées immédiatement à la reperfusion. Les autres protocoles testés, en particulier en perischémique, ne montrent aucune efficacité.<sup>342</sup> L'effet neuroprotecteur semble donc variable selon les modèles et les protocoles.

La perméabilité différente de la BHE chez le jeune pourrait influencer la biodisponibilité intracérébrale de la CsA. On sait que la pharmacocinétique de la CsA est souvent imprévisible, par voie orale ou intraveineuse. La biodisponibilité peut ainsi varier de 20% à 50%, avec une concentration maximale retrouvée 4h après l'administration.<sup>368</sup> De plus, la CsA est transportée à

l'extérieur du cerveau grâce à un transporteur P-glycoprotéique spécifique, codé par le gène MDR, qui limite la concentration intracérébrale, et joue un rôle de barrière pharmacologique.<sup>370</sup> Ces P-glycoprotéines ont un rôle déterminant sur le transport cérébral des xénobiotiques.<sup>371</sup> La maturation de ces systèmes de transport débute pendant la période anténatale et se poursuit en postnatal.<sup>372</sup> Chez le rat, l'expression de ces protéines semble réduite par rapport à l'adulte et pourrait expliquer l'inefficacité du transporteur.<sup>373</sup> Au final, la CsA pourrait s'accumuler de manière importante, majorer les effets neurotoxiques et limiter les effets neuroprotecteurs.<sup>374</sup> Le pré-traitement 14 h avant ischémie pourrait avoir eu pour conséquence de limiter la concentration sérique et intracérébrale du médicament au moment de la reperfusion.

Les mécanismes neuroprotecteurs de la CsA pourraient faire intervenir l'interaction avec la Calcineurine.<sup>375</sup> La Calcineurine est une des enzymes clés de la régulation de nombreuses protéines neuronales.<sup>375</sup> La Calcineurine déphosphoryle et surexprime l'activité de la NOS induisant une augmentation de la production de NO dans les neurones. Le NO est un médiateur important de la transmission neuronale, mais également un puissant vasodilatateur synthétisé par les cellules endothéliales. L'effet du NO peut être double, avec parfois une activation des processus excitotoxiques. La CsA agit également sur une famille de protéines appelée immunophilines, dont fait partie la CyP-D et la CyP-A. Dans le cytosol, la CsA forme un complexe CsA-Cyp-A. Le complexe inhibe in fine la Calcineurine cytosolique, réduit la synthèse de NO par la NOS phosphorylée. Cet effet pourrait soit être bénéfique par réduction d'apoptose, soit délétère par augmentation de la vasoconstriction, réduction du DSC à la reperfusion, majoration de l'ischémie. Nos résultats ont montré que l'apoptose était diminuée dans le cytosol (réduction de l' $\alpha$ -spectrine clivée) alors que les protéines mitochondriales n'étaient pas encore libérées (AIF, Cox1), plaidant pour un effet anti-apoptotique de la CsA via la Calcineurine. L'effet vasculaire de la CsA via la réduction de la synthèse NO n'a pas été étudié. Par ailleurs, l'effet de la CsA sur la Calcineurine est probablement impliqué dans les effets anti-inflammatoires<sup>376</sup>

Au final, il existerait des mécanismes spécifiques pour tenter d'expliquer l'absence d'effet neuroprotecteur de la CsA à la reperfusion (effet BHE?, réduction NO?), observés dans notre modèle d'ischémie focale transitoire, mais également décrits dans un modèle d'H-I.<sup>341</sup>

#### *Effet de l'ischémie et de la CsA sur le pore mPTP*

Nous avons mis en évidence que l'ischémie altère la capacité de rétention du  $\text{Ca}^{2+}$  (CRC) par la mitochondrie et favorise l'ouverture du pore mPTP. Lorsque les animaux ont reçu un traitement par CsA (10mg/kg) 14h avant l'ischémie, la CRC est préservée et comparable au niveau basal. Les publications sont nombreuses désormais sur l'implication du pore mPTP dans l'ischémie myocardique et cérébrale adultes. Le pore mPTP est devenu une cible privilégiée en cardioprotection<sup>377</sup> et en neuroprotection.<sup>278, 378</sup> Mais très peu de données existent dans l'ischémie néonatale. L'équipe de Hagberg a travaillé sur ce sujet, dans le modèle d'H-I chez le raton P7.<sup>26</sup>

La démonstration de l'existence du pore a été faite par quantification de [ $^{14}\text{C}$ ] deoxy-glucose-6P accumulé dans la mitochondrie, traduisant la perméabilisation des membranes mitochondriales au cours de l'ischémie.<sup>341</sup> L'accumulation est retrouvée maximale à 90 min de reperfusion, associée à une seconde accumulation à 8 h en rapport avec une défaillance énergétique secondaire. L'administration de CsA à la reperfusion ne réduisait pas les lésions cérébrales, ni n'améliorait la respiration mitochondriale. Les auteurs ont conclu à l'existence du pore mPTP, mais sans effet de la CsA sur les fonctions mitochondriales. Par la suite, ils ont montré que la CyP-D ne jouait pas un rôle décisif dans les processus ischémiques chez le jeune.<sup>302</sup> L'ouverture du pore mPTP était fonctionnellement liée à Bax, alors que la CyP-D tendait à inhiber son ouverture. Nous avons montré ici des résultats contradictoires avec ceux de Haberg et al. avec cependant une différence dans le timing des événements. En effet, nous nous situons à la phase très précoce de la reperfusion (40 min). La diminution de la CRC traduit déjà les conséquences de l'ischémie, et sa récupération par la CsA signe l'interaction de la CyP-D avec le pore mPTP. Mais, l'absence de libération d'AIF dans le cytosol indique aussi que la perméabilisation mitochondriale n'est pas encore effective. Il se pourrait que la CyP-D intervienne précocement sur le pore mPTP à la reperfusion, alors que Bax n'interviendrait que de manière retardée dans l'activation des processus apoptotiques.<sup>302</sup> Dans le modèle Renolleau, la surexpression de Bax apparaît entre 12 h et 96 h de reperfusion.<sup>37</sup> Les deux mécanismes pourraient donc être successifs au cours de l'ischémie cérébrale néonatale.

#### *Effet de l'ischémie et de la CsA sur la respiration mitochondriale*

Nous avons montré que l'ischémie focale du nouveau-né altérait la respiration mitochondriale par un phénomène de découplage de la chaîne respiratoire. La consommation d' $\text{O}_2$  par la mitochondrie en présence de substrat glutamate + ADP (état 3) est effondrée immédiatement à la reperfusion (40 min), alors que la consommation d' $\text{O}_2$  sans ADP (état 4) est normale. Le ratio état3/état4 (RCR), un des meilleurs paramètres pour évaluer la qualité de la phosphorylation oxydative, est abaissé. Il faut préciser que l'interprétation de l'état 4 est délicate. L'état 4 représente l'énergie nécessaire pour le maintien des équilibres électrochimiques et des potentiels de membranes, c'est-à-dire pour lutter contre la fuite protonique spontanée à travers la membrane mitochondriale interne. L'état 4 pourrait simplement traduire la persistance de l'intégrité des membranes mitochondriales.

Par rapport aux modèles d'ischémie focale adultes, il faut noter qu'il est parfois difficile de comparer les valeurs obtenues pour l'état 3, l'état 4, RCR à celles des modèles néonataux. Nos valeurs mesurées sont cohérentes avec celles retrouvées par Nakai et al. en basal chez le raton nouveau-né.<sup>292</sup> Puka-Sundvall et al. retrouvent des valeurs basales inférieures pour les états 3 et 4 mais un RCR comparable (4,6<sup>341</sup> et 5,4<sup>337</sup>). Les conditions expérimentales influencent les résultats, en particulier à cause des substrats utilisés et des modes de préparation des



mitochondries. La présence de synaptosomes augmente les valeurs de la respiration mitochondriale. Plus intéressant pour la compréhension des processus ischémiques semblent être les variations des mesures évaluées en pourcentage par rapport aux valeurs de base. On note après 2h d'une ischémie focale chez l'adulte, une diminution de l'état 3 et du RCR de 35-40% pour la pénombre et 60% pour le cœur de l'infarctus, sans modification significative de l'état 4.<sup>295, 321</sup> Anderson et al. retrouvent une réduction globale de 56% pour l'état 3.<sup>315</sup> Dans l'H-I néonatale, pendant l'ischémie l'état 3 diminue de 40-50%, le RCR de 50-53%, l'état 4 est inchangé.<sup>337, 341</sup> Aucune étude à ce jour n'avait évalué la respiration mitochondriale dans un modèle d'ischémie cérébrale focale néonatale. Nous avons complété nos résultats initiaux par des mesures perischémiques (données visualisables dans l'article 3). Au cours de l'ischémie, l'état 3 diminuait de 50% ( $9,55 \pm 1,33$  vs  $18,96 \pm 1,41$ ;  $p < 0,001$ ), le RCR de 43% ( $2,38 \pm 0,27$  vs  $4,13 \pm 0,1$ ;  $p < 0,001$ ). Au final, les modifications des paramètres de la respiration mitochondriale pendant l'ischémie sont cohérentes avec les données de l'ischémie focale adulte et de l'H-I néonatale.

Nous avons également montré que la CsA améliorait le RCR à la reperfusion si elle est administrée 14 h avant l'ischémie. Fait étonnant, cette amélioration passe par une réduction de l'état 4 ( $2,72 \pm 0,83$  Isch-CsA vs  $3,46 \pm 0,75$  Isch seule) sans modification significative de l'état 3. L'explication concernant l'effet de la CsA sur l'état 4 reste mal comprise. Il pourrait être dû à l'action de la CsA sur le contrôle des équilibres électrochimiques de la mitochondrie dont la cause ou la conséquence serait une moindre dépense énergétique: action via le pore mPTP? Autres voies de signalisation? Transporteur ionique? D'autres expérimentations seront nécessaires afin de comprendre ce mécanisme. L'amélioration de la respiration mitochondriale s'explique aussi par une meilleure vitalité des mitochondries du fait de la réduction de l'ouverture du pore de perméabilité, de la diminution de la sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  vers le cytosol, de la diminution de l'activation de l'apoptose. Puka-sundvall et al. n'ont pas réussi à mettre en évidence ni un effet neuroprotecteur ni un effet sur le pore mPTP ou sur la respiration mitochondriale.<sup>341</sup> Si l'amélioration de la respiratoire mitochondriale est principalement due à une réduction des effets délétères induits par l'ouverture du pore, alors il est logique qu'ils n'aient pas mis en évidence d'effet bénéfique sur le couplage de la chaîne respiratoire.

En résumé, dans ce modèle d'ischémie cérébrale focale transitoire, la CsA agit sur le pore mPTP par l'intermédiaire, comme chez l'adulte, de son interaction avec la CyP-D. La CsA reverse les effets délétères de l'ischémie sur la formation du pore. La reperfusion est un phénomène dynamique complexe, prolongé et variable. Les résultats de la CsA dans l'hypoxie-ischémie néonatale ne sont pas obligatoirement en contradiction avec nos résultats, mais ces processus CYP-D-dépendant et Bax-dépendant s'associent peut être dans le temps au cours de la reperfusion. Finalement, la CsA améliore la phosphorylation oxydative probablement de manière indirecte par le maintien de l'intégrité des membranes et des équilibres électrochimiques (force motrice protonique) indispensables au fonctionnement de la chaîne respiratoire.

## 5.2 -- Discussion à propos de l'article 2

Nous aborderons les deux principales questions soulevées par cet article:

- 1) Comment s'interprètent les résultats obtenues par le PCi, en termes de neuroprotection, dans l'ischémie cérébrale focale du jeune par rapport à ceux de l'ischémie adulte?
- 2) Quels sont les mécanismes qui peuvent expliquer l'absence d'hyperhémie et les dysfonctions microcirculatoires observées?

### *Absence d'effet neuroprotecteur du PCi dans l'ischémie cérébrale focale néonatale*

Dans notre modèle expérimental, nous avons mis en évidence une absence de réduction du volume des lésions cérébrales par plusieurs protocoles de PCi (30 s, 1 min, 5 min, et une reperfusion graduelle avec déclampage alterné L/R et R/L).

La première démonstration de l'efficacité du PCi dans l'ischémie a été réalisée dans un modèle d'ischémie myocardique chez le chien.<sup>379</sup> Le PCi consistait en 3 cycles successifs de ré-occlusion 30 s /reperfusion 30 s au décours d'une ischémie par occlusion de l'artère coronaire gauche pendant 60 min. Le résultat était une réduction de la taille de l'infarctus, qui ne représentait plus que 14% de la zone à risque comparé au 25% dans le groupe contrôle. Par la suite, d'autres travaux dans l'ischémie myocardique ont confirmé ces résultats.<sup>380, 381</sup> De nombreux protocoles ont été testés en variant les durées de cycles, le nombre de cycles réalisés, le délai d'initiation après la reperfusion.<sup>382</sup> Aucun consensus réel n'a pu être établi quant à la détermination du protocole le plus efficace. Selon les espèces étudiées et la durée de l'ischémie myocardique l'efficacité pouvait ainsi varier fortement.<sup>383</sup> Chez le rat, l'augmentation du nombre de cycles n'induit pas obligatoirement une amélioration de l'effet cardioprotecteur.<sup>384</sup> L'effet protecteur du PCI myocardique est désormais prouvé chez la souris <sup>385</sup>, le lapin <sup>386</sup>, le singe <sup>387</sup> et enfin l'homme.<sup>275</sup> La durée qui sépare la première publication animale (2003) et celle chez l'homme (2005) montre à quel point l'engouement pour cette nouvelle voie de recherche a été importante. Le PCi agit sur les RI et limite les phénomènes d'agressions secondaires du tissu myocardique.<sup>381</sup> Au déclampage, la reperfusion massive et brutale est responsable d'une reperfusion dit " de luxe" ou hyperhémique, en rapport avec une profonde vasodilatation artérielle. Cette "RI" est délétère par la mise en jeu des mécanismes au niveau de la mitochondrie de la production excessive de ROS, de l'ouverture du pore mPTP, de la perte de l'intégrité des membranes, de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  et de protéines pro-apoptotiques puis la carence énergétique par altération de la phosphorylation oxydative.<sup>234</sup> Le PCi interrompt l'hyperhémie précoce et prévient l'activation des voies de signalisation de mort cellulaire. Il a été suggéré que l'effet bénéfique du PCi serait davantage lié au maintien initialement d'une acidose tissulaire, un retard à la normalisation du pH à la reperfusion limitant les mouvements ioniques ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) et la perte d'intégrité des

membranes cellulaires.<sup>230, 231, 388</sup> Dans notre modèle néonatal, la présence d'une reperfusion lente graduelle tendrait ainsi à maintenir un pH plus longtemps bas, et à induire une "neuroprotection endogène spontanée" inhérente au modèle. Cette hypothèse est confortée indirectement par des volumes lésionnels en moyenne relativement faibles (10 à 15%).<sup>236, 389</sup> Dans ce sens, la reperfusion graduelle par déclampage successif des carotides a bien montré qu'elle réduisait le volume des lésions de 32% dans l'ischémie adulte, donc un effet protecteur comparable au PCi.<sup>184</sup> Néanmoins, lorsque l'hypoperfusion est trop prolongée ou sévère, l'effet observé peut être inverse par majoration de la période d'ischémie. Nous pouvons suspecter qu'un tel mécanisme puisse expliquer certaines lésions très importantes (score 3 avec atteinte pan-hémisphérique). Cet élément est probablement lié à la faible collatéralité chez ces animaux, se traduisant sur le plan fonctionnel par une « ischémie de reperfusion » équivalent à un modèle d'ischémie permanente.

Le PCi a été testé dans d'autres organes que le myocarde, en particulier dans l'ischémie cérébrale adulte avec les travaux inauguraux de Zhao H.<sup>331</sup> Les auteurs ont testé le PCi dans un modèle d'ischémie cérébrale focale transitoire chez le rat consistant en une électrocoagulation de l'ACM suivi d'un clampage bicarotidien pendant 15, 30 ou 60 min (modèle identique au modèle Renolleau chez le raton P7!). Le PCi était une série de 3 cycles de réocclusion 10 s / reperfusion 30 s. Pour les durées d'ischémie de 15, 30 et 60 min, les lésions cérébrales ont été réduites respectivement de 80%, 51% et 17%. Sur le plan de la perfusion tissulaire laser doppler, l'hyperhémie était complètement abolie et le FST maximal restait inférieur au niveau basal. Le lien entre l'hyperhémie et le PCi était clairement établi sans pour autant pouvoir décrypter les mécanismes cellulaires sous-jacents. Plusieurs études ont depuis confirmé l'effet neuroprotecteur du PCi dans l'ischémie cérébrale adulte chez le rat.<sup>184, 185, 268, 363, 390-396</sup> Aucune publication à ce jour concernant l'ischémie cérébrale néonatale. L'hétérogénéité d'efficacité des protocoles semble exister également dans l'ischémie cérébrale<sup>184, 363</sup>, probablement davantage lorsque le PCi est induit de manière retardée par rapport au début de la reperfusion.<sup>392</sup> L'effet sur l'hyperhémie et sur l'acidose est alors plus modeste. Il reste que les mécanismes neuroprotecteurs exactes du PCi retardé restent mal compris et vraisemblablement assez différents.

L'augmentation rapide de la littérature concernant le PCi dans le myocarde et le cerveau ont permis l'avancée des connaissances à propos des mécanismes, des médiateurs et des voies de signalisation impliquées. La décapitation de l'hyperhémie est le principal déclencheur de processus plus complexes aboutissant à l'activation de voies de survie cellulaire. L'interruption de la reperfusion semble limiter l'hyperoxygénation tissulaire immédiate. Les dysfonctions de la phosphorylation oxydative ne permettent plus à l'O<sub>2</sub> d'être utilisé pour la synthèse d'ATP.<sup>295, 314, 315,</sup><sup>325</sup> L'O<sub>2</sub> est alors détourné vers la production de radicaux libres.<sup>237</sup> Zhao et al. ont prouvé que le PCi diminuait la production d'anions superoxydes dans la zone de pénombre et le nombre de cellules TUNEL(+).<sup>331</sup> La diminution de la peroxydation des lipides membranaires est un autre élément de preuve de l'action du PCi sur le stress oxydatif. L'activité des enzymes antioxydantes est restaurée, tel que la SOD ou les catalases.<sup>391, 397</sup> Le PCi inhibe les processus inflammatoires,

le recrutement des leucocytes (réduction de l'activité myélopéroxydase), et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ).<sup>391</sup> Concernant l'apoptose, la translocation de Bax vers la mitochondrie diminue de même que la libération du cytochrome c dans le cytosol, indiquant un rôle probable du pore de perméabilité mPTP.<sup>362, 391</sup> L'implication du pore a d'ailleurs été récemment confirmée par Sun et al. In vivo, les auteurs confirment que le PCi inhibe l'ouverture du pore mPTP, avec une action synergique de la CsA. In vitro sur mitochondries isolées, la capacité de rétention du Ca<sup>2+</sup> par la mitochondrie est fortement améliorée.<sup>396</sup> Les auteurs concluent au rôle crucial du pore mPTP dans les mécanismes de neuroprotection mis en jeu par le PCi.

Certaines voies de survie cellulaire semblent activées au cours de PCi. Comme pour le PCi myocardique, la voie RISK (reperfusion Injury Salvage Kinase) semble être une voie privilégiée.<sup>232, 288</sup> La protéine Akt est la pierre angulaire de cette voie de signalisation. Au cours du PCi, Akt est surexprimée et son inhibition bloque l'effet neuroprotecteur.<sup>363, 395</sup> Ensuite, le PCi via Akt active les protéines ERK<sub>1/2</sub>, p38<sup>363</sup>, PKC- $\epsilon$ , GSK3- $\beta$ .<sup>395</sup> La voie de signalisation RISK possède de nombreuses ramifications et va aller inhiber les protéines pro-apoptotiques. Le PCi active la PKC- $\epsilon$  dont la cible sur la mitochondrie est le pore mK<sup>+</sup>-ATP.<sup>394</sup> Au final, le PCi semble mettre en jeu les mêmes acteurs dans le cœur et dans le cerveau. Néanmoins, les différences observées en termes de réduction du volume des lésions nous amènent à penser qu'il existe probablement des spécificités d'organes associées.

#### *Absence d'hyperhémie chez le jeune et dysfonctions microcirculatoires*

Dans notre modèle d'ischémie cérébrale transitoire néonatale, de manière surprenante, nous n'avons pas mis en évidence d'hyperhémie à la phase précoce de la reperfusion. L'hyperhémie est le déclencheur de mécanismes cellulaires délétères responsables de lésions dites induites par la reperfusion. Le PCi limite la formation de ces RI en limitant de manière mécanique cette hyperhémie.<sup>184, 185, 331, 396</sup> Donc, l'hyperhémie est indispensable au PCi. C'est pourquoi l'absence d'hyperhémie dans notre modèle est l'élément principal d'échec du PCi. Les résultats dans notre étude apportent quelques éléments de réponse quant aux processus physiopathologiques de la reperfusion progressive.

Premièrement, les Vm dans les carotides sont basses à la reperfusion. De plus, le FST est effondré dans le territoire ischémié et la vitesse de reperfusion tissulaire est faible. Ces résultats montrent qu'il existe une vasoconstriction dans les carotides intense et durable. La perfusion tissulaire diminuée signe une vasoconstriction du lit artériolaire et capillaire. Le laser doppler est un outil d'évaluation de la microcirculation régionale. Quant au doppler ultrason il permet de mettre en évidence le retentissement de la perfusion de la microcirculation sur les gros vaisseaux. En résumé, la vasoconstriction observée au niveau de la macrocirculation est la conséquence de la vasoconstriction de la microcirculation. La dysfonction de la microcirculation cérébrale est présente dans l'ischémie cérébrale transitoire néonatale.

Il est difficile d'aborder la notion de dysfonction de la microcirculation cérébrale sans avoir défini préalablement la notion de fonctionnement normal de la microcirculation. La microcirculation est un système complexe qui régule le débit sanguin régional en fonction de la demande métabolique (couplage neurométabolique ou neurovasculaire). L'hyperhémie est la conséquence d'une dysrégulation de la microcirculation qui apparaît au cours de l'ischémie adulte. La circulation cérébrale occluse entraîne un effondrement brutal du débit sanguin en aval, alors que le métabolisme cérébral est inchangé. La vasodilatation cérébrale perischémique cherche à compenser l'hypoperfusion par un effondrement des RVC. En l'absence de suppléance de la vascularisation par des collatérales, l'ischémie persiste. La mise en jeu de ces collatérales dans l'ischémie cérébrale transitoire néonatale est précoce.<sup>35</sup> La redistribution du DSC a lieu par l'intermédiaire du polygone de Willis. La compensation est objectivée dès 15 min du début de l'ischémie, se traduit par une augmentation des Vm dans le TB. Cette compensation est corrélée à la survenue de lésions cérébrales.<sup>35</sup> Dans cet article, nous avons montré que les Vm mesurées dans le TB pendant l'ischémie étaient corrélées à la gravité des lésions cérébrales: Vm= 165%  $\pm$  14 du niveau basal pour les lésions score 0, 139%  $\pm$  22 pour les lésions score 1. A contrario, les animaux qui ne présentaient aucune compensation dans le TB (97%  $\pm$  14) avaient les lésions les plus sévères.<sup>35</sup> L'étude mettait donc en évidence le rôle crucial de la collatéralité au cours de l'ischémie dans le cerveau immature. Même si les collatérales existent dans le cerveau adulte le recrutement semble plus difficile et le réseau moins étendu que chez le jeune.<sup>51, 52</sup> Au final, la perfusion résiduelle perischémique chez le jeune est davantage préservée que chez l'adulte et influence en conséquence l'importance de la vasodilatation de la microcirculation.

Les mécanismes impliqués dans le recrutement des collatérales sont complexes. Les modifications des RVC pendant l'ischémie jouent un rôle. La microcirculation cérébrale est régulée par une balance entre substances vasodilatrices (NO, adénosine) et substances vasoconstrictrices (endothéline). Cette régulation est sous le contrôle de l'activité cérébrale (couplage neurométabolique) qui adapte le tonus vasomoteur cérébral aux besoins métaboliques en O<sub>2</sub>. L'endothélium vasculaire a un rôle primordial par la synthèse et la libération du NO, via l'activation de la NOS endothéliale (eNOS), vers les cellules musculaires lisses des vaisseaux.<sup>398</sup> Mais le NO peut être synthétisé également par les neurones, via la NOS neuronale (iNOS), qui joue un rôle dans la transmissions synaptique. Elle est activé lors de l'ischémie<sup>399, 400</sup> et sa libération induit des mécanismes apoptotiques en plus de ses d'effets vasculaires.<sup>401</sup> Au final, le NO peut avoir un effet bénéfique ou délétère dans l'ischémie néonatale.<sup>402, 403</sup> Nous avons montré récemment que le NO est un acteur majeur dans le recrutement des collatérales dans le cerveau immature.<sup>236</sup> La eNOS et la nNOS possèdent toutes les deux un effet vasodilatateur sur la circulation cérébrale. Le L-NAME inhibe de manière non spécifique les deux NOS. On note alors une diminution de la compensation mesurée dans le TB pendant l'ischémie et majore les lésions cérébrales. Cet effet vasodilatateur pendant l'ischémie est donc NO-dépendant.<sup>236</sup>

A la reperfusion, on observe une vasoconstriction artérielle qui peut être liée à un déficit de synthèse du NO endogène. Ce déficit peut être seulement relatif par rapport aux besoins en NO à la reperfusion, c'est à dire la "dose de NO" nécessaire pour adapter le DSC aux besoins métaboliques. Les questions qui viennent alors sont de savoir quels sont les besoins métaboliques à la phase précoce de la reperfusion dans un cerveau immature? L'effet vasoconstricteur est-il inadapté aux besoins métaboliques? Cette dernière question reviendrait à considérer cette vasoconstriction comme la traduction d'une dysfonction microcirculatoire comme la vasodilatation « hyperhémique » de l'adulte. Les études réalisées dans l'H-I néonatale tendent à montrer que pendant la reperfusion, la consommation en glucose reste importante pour compenser la carence énergétique accumulée.<sup>404</sup> La persistance d'un déficit énergétique est corrélée à la majoration des lésions cérébrales.<sup>405</sup> Même si il est délicat de conclure sans données métaboliques, il paraît possible de considérer que les besoins métaboliques, au sortir de l'ischémie, sont élevés. On peut donc faire l'hypothèse que la vasoconstriction et donc la réduction du DSC sont inadaptés par rapport aux besoins des cellules cérébrales. Ce paradoxe traduit alors bien une dysfonction de la microcirculation cérébrale.

Mais cette dysfonction est-elle due à une carence vraie ou relative en médiateurs vasodilatateurs ou à une déficience du lit artériolaire aux stimuli vasodilatateurs ? Pour répondre à cette question, nous avons testé la vasoréactivité cérébrale au CO<sub>2</sub> et au NOi. L'épreuve de VRCO<sub>2</sub> ne retrouvait pas d'augmentation des DSC après inhalation de CO<sub>2</sub>, mais en absence de modifications des DSC chez les animaux naïfs, l'interprétation devenait délicate. Mais l'absence d'effet vasodilatateur mis en évidence lors de l'administration de NO inhalé évoquait plutôt une absence de réactivité artériolaire et non une carence en NO.

Au final, dans notre modèle d'ischémie cérébrale transitoire néonatale, la reperfusion progressive est due à un état de vasoconstriction de la microcirculation cérébrale probablement en rapport avec une dysfonction endothéliale et vasculaire NO-indépendante, et le signe d'un découplage neurométabolique. Toutefois, en l'absence de données métaboliques précises, on ne peut exclure que cette situation puisse être liée à une réduction des besoins métaboliques. La caractérisation de la redistribution dynamique des DSCr et l'étude du fonctionnement de la chaîne respiratoire à la phase précoce de la reperfusion a fait l'objet de l'article suivant.

### 5.3 -- Discussion à propos de l'article 3

Les principaux résultats avancés dans cet article attestent que la reperfusion précoce est un phénomène progressif sans accès d'hyperhémie dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire néonatale et surtout que ce profil est identique dans l'hémisphère ipsilatéral et contralatéral.

#### *Reperfusion microcirculatoire, redistributions régionales du DSC*

Le Doppler ultrasons quantifie le flux sanguin circulant dans les artères cérébrales, donc dans la macrocirculation. La macrocirculation est intimement liée à la microcirculation qui régit les mécanismes de régulation du tonus vasomoteur en fonction de la situation métabolique et hémodynamique. En réalité Le Doppler et le LDP caractérisent tous les deux des processus naissant de la microcirculation. Le Doppler ultrasons a permis de montrer que la cinétique de reperfusion était identique dans les deux carotides. Notre modèle possède de nombreuses anastomoses vasculaires intra- et inter-hémisphériques qui limitent la sévérité de l'ischémie dans la zone à risque et le volume des lésions cérébrales.<sup>33, 35</sup> Cet élément est très important à prendre en compte pour analyser correctement les résultats en Doppler ultrasons. En effet, il est difficile d'expliquer que les Vm droites soient réduites par rapport aux Vm gauches, puisque l'AVC est gauche. L'effondrement bilatéral des Vm prouvent que le DSC total est diminué.<sup>35</sup> La diminution des Vm traduit un état de vasoconstriction et d'hypoperfusion sans que l'on puisse savoir comment le DSC se distribue dans les deux hémisphères. Pour cela nous avons exploré la perfusion tissulaire corticale superficielle et la perfusion cérébrale profonde.

Grâce au LDP, la perfusion tissulaire corticale superficielle a été explorée dans les deux hémisphères pendant l'ischémie. Dans notre modèle la perfusion tissulaire perischémique était réduite dans les deux hémisphères correspondant à un FST=18% du niveau basal. A la reperfusion, le FST gauche ne revenait pas au niveau basal, ni même au niveau post-électrocoagulation de l'ACM (Article N°2, Figure 2). Le FST droit ne retournait pas non plus à son niveau basal. A la différence de l'ischémie néonatale, chez l'adulte la vasodilatation au moment du déclampage est intense à cause d'un réseau anastomotique peu recruté.<sup>406</sup> Ce réseau existe et a été mise en évidence précocement pendant l'ischémie mais régresse à la reperfusion.<sup>406</sup> Ici, le tonus vasomoteur de la microcirculation est de vasoconstricté et s'oppose à la vasodilatation observée dans l'ischémie adulte. Cette vasoconstriction de la microcirculation corticale superficielle affecte les deux hémisphères de manière sensiblement identique. Néanmoins, il est raisonnable d'imaginer que la dysfonction microcirculatoire puisse être moins sévère au niveau de

l'hémisphère droit, et que l'absence de différence observée pourrait être due à la sensibilité de la technique LDP.

En résumé, la collatéralité est mise en jeu dès la période d'ischémie et en modifie le tonus vasomoteur. L'hypoperfusion tissulaire est bilatérale. Mais cette situation de vasoconstriction artériolaire et capillaire est-elle adaptée aux besoins métaboliques des cellules cérébrales? Nous reviendrons plus loin sur cette question à partir des résultats de la respiration mitochondriale.

Après avoir mise en évidence l'hypoperfusion macrocirculatoire et microcirculatoire au niveau cortical, il nous fallait comprendre de quelle manière se répartissait le DSC dans les structures cérébrales profondes. L'autoradiographie au [<sup>14</sup>C]-iodoantipyrine permet de déterminer les DSCr. L'autoradiographie a apporté des éléments fondamentaux dans la compréhension de la perfusion cérébrale du raton naïf puis dans le modèle. Concernant les animaux naïfs, la première constatation est celle la distribution du DSC dans un cerveau immature. Le DSC se répartit en DSCr différents selon les régions cérébrales. Les régions les plus postérieures comme le tronc cérébral présentent les DSCr les plus élevés (129 ml/min/100g de tissu cérébral) en comparaison avec les DSCr des structures cérébrales antérieures (80ml/min/100g) ; les noyaux gris centraux présentent des DSCr intermédiaires (80 à 120 ml/min/100g). Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus par Lyons et al. sur des ratons P7.<sup>407</sup> Les DSCr retrouvés semblaient globalement plus faibles (20 à 70 ml/min/100g) mais prédominaient au niveau du tronc cérébral. Chez le rat adulte, les DSCr étaient globalement plus élevés (40 à 160 ml/min/100g), avec une augmentation des DSCr dans le cortex (140-150 ml/min/100g).<sup>408</sup> Pour ces deux études, les valeurs les plus faibles étaient représentées par la substance blanche. A P10, les DSCr retrouvés par Nehlig et al. sont relativement homogènes, hormis les régions postérieures mieux perfusées (mésencéphale, tronc cérébral, nerf trigéminal).<sup>409</sup> Au total, les DSCr mesurés dans notre étude sont plus élevés en moyenne que dans les études antérieures réalisées chez des ratons Sprague-Dawley.<sup>407, 409</sup> Nos résultats confirment la prédominance de la perfusion des régions postérieures chez le jeune alors que les régions corticales antérieures sont moins sollicitées. Le cervelet et le tronc cérébral contrôlent et régulent les grandes fonctions vitales végétatives, respiratoires, cardiovasculaires. L'existence d'un gradient de perfusion rostro-caudal va dans le sens de cette hypothèse.

Au cours de l'ischémie, les DSCr des régions corticales et antérieures sont les plus sévèrement diminués (6 à 19 ml/min/100g). Les DSCr des régions postérieures sont augmentés du côté gauche (148 vs 129 ml/min/100g) traduisant la compensation perischémique à partir du TB.<sup>35</sup> Dans le modèle d'H-I néonatal, les DSCr dans le territoire de la carotide droite du côté de la lésion sont fortement réduits.<sup>26</sup> Au niveau du tronc cérébral et du cervelet, on observe une augmentation significative des DSCr traduisant également un phénomène de compensation perischémique.<sup>28</sup> Dans notre étude, les DSCr s'effondrent dans les territoires vascularisés majoritairement par les carotidiennes (régions antérieures) mais on ne constate pas de différence



significative sur les DSCr entre les hémisphères. Cet élément prouve que la seule valeur du DSCr pendant l'ischémie ne suffit pas à expliquer la constitution d'une lésion ischémique, puisque les animaux opérés ne présentent pas de lésion de l'hémisphère droit. Au niveau de l'hémisphère droit, l'hypoperfusion est insuffisante pour aboutir à la mort cellulaire. Néanmoins, cette hypoperfusion à droite n'est pas sans conséquence puisque la mise en place de certains processus apoptotiques « avortés » ont déjà été décrits dans ce modèle, spécialement l'activation de la caspase 3.<sup>31</sup>

Au cours de la reperfusion, la redistribution du DSCr permet une compensation partielle des DSCr de l'hémisphère droit (30 à 50 ml/min/100g) versus l'hémisphère gauche (18 à 35 ml/min/100g). La réduction bilatérale des DSCr dans les régions profondes et superficielles par rapport au niveau basal (80 à 120 ml/min/100g), alors que le déclampage est survenu, traduit la persistance d'une hypoperfusion cérébrale globale par vasoconstriction microcirculatoire. La récupération "insuffisante" du côté gauche par rapport au côté droit est le signe d'une altération plus importante de la microcirculation dans l'hémisphère gauche. Des résultats comparables obtenus dans le modèle H-I chez le raton P7 appuient nos résultats.<sup>360</sup> Oshima et al. ont étudié la reperfusion régionale par LDP dans les deux hémisphères, de manière rapprochée jusqu'à 9h, puis à 24h. Comme dans notre modèle, la reperfusion tissulaire à la levée de l'hypoxie était lente et progressive dans les 2 hémisphères, et ne retournait à son niveau de perfusion basal qu'à 9h.<sup>360</sup> Toutefois dès la sixième heure, le degré de réduction de la perfusion du côté ipsilatéral par rapport au contralatéral était corrélé à la sévérité des lésions cérébrales. Cette corrélation était la plus forte encore à 24h, alors qu'était observée une nouvelle détérioration de la perfusion ipsilatérale, au moment où se met en place la défaillance énergétique secondaire. Cette "carence relative de reperfusion ipsilatérale" confirme le rôle décisif de la reperfusion au cours des premières heures dans la constitution des lésions. Ceci ouvre la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques, différentes de celles de l'ischémie adulte, visant dans ces conditions de reperfusion progressive à tenter de restaurer une partie des DSCr, de manière ciblée, dans le territoire ischémié. Reste à savoir à quel est le moment le plus propice à ce type de stratégies. Nos résultats montrent que ces phénomènes apparaissent dès le début de la reperfusion, et que probablement une action très précoce pourrait être efficace. Il faut garder à l'esprit que le DSCr optimal à la reperfusion est inconnu, et probablement variable dans le temps. Il pourrait sûrement se résumer en « ni trop, ni trop peu ».

Enfin, la reperfusion dans notre modèle d'ischémie focale a suivi un triple gradient: caudo-rostral, ventro-dorsal et médio-latéral. Par ailleurs, les DSCr étaient augmentés dans les régions rhombencéphaliques, correspondant à une hyperhémie régionale. Cette hyperhémie traduit la persistance des phénomènes de recrutement des collatérales, déjà initiés au cours de l'ischémie. Au total, ces éléments prouvent l'importance du TB dans la cinétique de reperfusion dans ce modèle. La préservation des régions centrales pourrait également s'expliquer par une protection

accrue des territoires fonctionnellement importants (noyaux gris centraux vs le cortex moteur et sensitif).

#### *Anomalies du fonctionnement de la chaîne respiratoire*

Pendant la reperfusion précoce, la vasoconstriction bilatérale de la microcirculation cérébrale est-elle adaptée ou inadaptée aux besoins métaboliques ? Cette question renvoie à la notion de couplage neurovasculaire. Afin de tenter d'expliquer les phénomènes observés à la reperfusion, comme l'absence d'hyperhémie, l'hypoperfusion précoce, la dysfonction microcirculatoire, nous souhaitons pouvoir corréler ces éléments avec une évaluation du métabolisme cérébral.

Les explorations concernant le fonctionnement de la phosphorylation oxydative ont apportés de nombreux renseignements. Pendant l'ischémie, l'état 3 et le RCR étaient diminués dans les deux hémisphères d'environ 40%, avec une diminution plus importante à gauche (RCR =  $2,38 \pm 0,27$  à gauche vs  $2,73 \pm 0,31$  à droite). Alors que les valeurs des DSCr pendant l'ischémie n'ont pas montré de différence entre les deux hémisphères, ici l'exploration de la chaîne respiratoire montre que la « souffrance » cellulaire ischémique et ses conséquences sur la chaîne respiratoire sont différentes. Cet élément renvoie à la précision des techniques utilisées pour les mesures des DSCr. Mais il est donc probable que si des différences de DSCr existent entre les hémisphères, celles-ci soient faibles. Il est donc possible qu'il existe un « effet seuil » concernant le DSC perischémique, au dessus duquel l'hypoperfusion n'est pas suffisante pour induire une lésion ischémique. Cette hypothèse est cohérente avec la forte proportion d'animaux sans lésions dans le modèle Renolleau initial avec le clampage d'une carotide.<sup>35, 345</sup> Ce seuil est intimement lié à la notion de compensation perischémique par les anastomoses vasculaires. Il n'en reste pas moins que les dysfonctions perischémiques de la chaîne respiratoire influencent la cinétique de la reperfusion et de la restauration du métabolisme mitochondrial. La récupération de l'état 3 et du RCR est meilleure à droite qu'à gauche (81% vs 63% du niveau basal), ce qui traduirait encore que les conséquences de l'hypoperfusion sur l'hémisphère droit ont été moins sévères.

L'altération de la phosphorylation oxydative pourrait être secondaire à une altération des complexes de la chaîne respiratoire. Les radicaux libres produits au cours des processus ischémiques sont responsables de dommages causés aux complexes de la chaîne respiratoire, et de leurs dysfonctionnements, en particulier les complexes I, IV et V.<sup>410-412</sup> A la reperfusion, la chaîne respiratoire déficiente ne permet plus à l'O<sub>2</sub> et aux substrats de produire l'ATP, mais induit la synthèse excessive de radicaux libres.<sup>413</sup> L'inhibition du complexe I dans l'H-I néonatal a montré une réduction du volume lésionnel par le biais d'une réduction de la synthèse d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>339</sup>

En fait, les explorations menées sur l'exploration de la phosphorylation oxydative ne peuvent pas permettre d'évaluer les besoins métaboliques des cellules cérébrales in vivo, et donc de faire une évaluation du couplage neurovasculaire. L'exploration plus poussée du métabolisme cellulaire (comme la consommation en oxygène ou en glucose par les cellules) devra être réalisé

si l'on souhaite comprendre plus avant les mécanismes hémodynamiques de la reperfusion chez le jeune.

## 5.4 -- Conclusion Générale

Les travaux expérimentaux que nous avons réalisés pour comprendre les mécanismes hémodynamiques cérébraux dans notre modèle d'ischémie transitoire focale néonatale ont mis en évidence l'importance de la reperfusion et des modifications métaboliques dans les processus ischémiques.

L'altération de la chaîne respiratoire et l'implication du pore mPTP dans l'ischémie du jeune sont désormais démontrés. L'effet de la CsA sur la mitochondrie a également permis de conclure au rôle de la CyP-D dans la constitution du pore mPTP. Malgré l'absence de réduction du volume lésionnel, la CsA améliore la phosphorylation oxydative et même temps qu'elle limite l'ouverture du pore mPTP. Les mécanismes d'action de la CsA sur la respiration mitochondriale restent encore à être précisés.

La reperfusion a été évaluée de manière multimodale, tant sur le plan macrocirculatoire que microcirculatoire. Les principaux éléments mis en évidence sont une reperfusion lente et progressive chez le nouveau-né par rapport à l'adulte. L'absence de d'hyperhémie de reperfusion remet en cause les concepts physiopathologiques existants dans l'ischémie adulte, à savoir une vasodilatation intense liée à un profond bas débit perischémique et à un faible recrutement de collatérales. Nous avons ainsi pu décrire que la vasoconstriction microcirculatoire était présente dès la phase précoce de la reperfusion, liée à un recrutement des collatérales dès la période ischémique aboutissant à une hypoperfusion moins profonde dans le territoire à risque. Par ailleurs, nous pouvons suspecter que cette dysfonction de la microcirculation est probablement une défaillance de vasoréactivité au NO. La redistribution des DSCr met en évidence que l'altération de la microcirculation cérébrale atteint les deux hémisphères, à la fois dans les régions corticales superficielles et les régions profondes.

Ces travaux de recherches ouvrent désormais la voie à l'exploration de nouvelles stratégies thérapeutiques visant, non plus à limiter l'hyperhémie comme pour le PCI, mais plutôt à optimiser les DSCr idéalement adaptés aux besoins métaboliques, et en évitant les phénomènes délétères de « perfusion de luxe » ou à l'inverse des périodes d'hypoperfusion prolongées. Enfin, d'autres travaux restent à être élaborés pour déterminer l'impact de la reperfusion tardive sur l'hypoperfusion et la défaillance énergétique secondaires.

## 6 -- Références bibliographiques

1. Lee J, Croen LA, Backstrand KH, Yoshida CK, Henning LH, Lindan C, Ferriero DM, Fullerton HJ, Barkovich AJ, Wu YW. Maternal and infant characteristics associated with perinatal arterial stroke in the infant. *JAMA*. 2005;293:723-729
2. Lynch JK, Nelson KB. Epidemiology of perinatal stroke. *Curr Opin Pediatr*. 2001;13:499-505
3. Schulzke S, Weber P, Luetschg J, Fahnenstich H. Incidence and diagnosis of unilateral arterial cerebral infarction in newborn infants. *J Perinat Med*. 2005;33:170-175
4. Barmada MA, Moossy J, Shuman RM. Cerebral infarcts with arterial occlusion in neonates. *Ann Neurol*. 1979;6:495-502
5. Schneider A, Laage R, von Ahsen O, Fischer A, Rossner M, Scheek S, Grunewald S, Kuner R, Weber D, Kruger C, Klaussner B, Gotz B, Hiemisch H, Newrzella D, Martin-Villalba A, Bach A, Schwaninger M. Identification of regulated genes during permanent focal cerebral ischaemia: Characterization of the protein kinase 9b5/mark11/mark4. *J Neurochem*. 2004;88:1114-1126
6. Hunt RW, Inder TE. Perinatal and neonatal ischaemic stroke: A review. *Thromb Res*. 2006;118:39-48
7. Nelson KB. Perinatal ischemic stroke. *Stroke*. 2007;38:742-745
8. Govaert P, Ramenghi L, Taal R, de Vries L, Deveber G. Diagnosis of perinatal stroke i: Definitions, differential diagnosis and registration. *Acta Paediatr*. 2009;98:1556-1567
9. Govaert P, Ramenghi L, Taal R, Dudink J, Lequin M. Diagnosis of perinatal stroke ii: Mechanisms and clinical phenotypes. *Acta Paediatr*. 2009;98:1720-1726
10. Govaert P, Smith L, Dudink J. Diagnostic management of neonatal stroke. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2009;14:323-328
11. Mercuri E, Rutherford M, Cowan F, Pennock J, Counsell S, Papadimitriou M, Azzopardi D, Bydder G, Dubowitz L. Early prognostic indicators of outcome in infants with neonatal cerebral infarction: A clinical, electroencephalogram, and magnetic resonance imaging study. *Pediatrics*. 1999;103:39-46

12. Gunther G, Junker R, Strater R, Schobess R, Kurnik K, Heller C, Kosch A, Nowak-Gottl U. Symptomatic ischemic stroke in full-term neonates : Role of acquired and genetic prothrombotic risk factors. *Stroke*. 2000;31:2437-2441
13. Kenet G, Lutkhoff LK, Albisetti M, Bernard T, Bonduel M, Brandao L, Chabrier S, Chan A, deVeber G, Fiedler B, Fullerton HJ, Goldenberg NA, Grabowski E, Gunther G, Heller C, Holzhauer S, Iorio A, Journeycake J, Junker R, Kirkham FJ, Kurnik K, Lynch JK, Male C, Manco-Johnson M, Mesters R, Monagle P, van Ommen CH, Raffini L, Rostasy K, Simioni P, Strater RD, Young G, Nowak-Gottl U. Impact of thrombophilia on risk of arterial ischemic stroke or cerebral sinovenous thrombosis in neonates and children: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Circulation*. 121:1838-1847
14. Hagberg H, Bona E, Gilland E, Puka-Sundvall M. Hypoxia-ischaemia model in the 7-day-old rat: Possibilities and shortcomings. *Acta Paediatr Suppl*. 1997;422:85-88
15. Roohey T, Raju TN, Moustogiannis AN. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: A critical analysis. *Early Hum Dev*. 1997;47:115-146
16. Yager JY, Ashwal S. Animal models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Neurol*. 2009;40:156-167
17. Derugin N, Ferriero DM, Vexler ZS. Neonatal reversible focal cerebral ischemia: A new model. *Neurosci Res*. 1998;32:349-353
18. Ashwal S, Cole DJ, Osborne S, Osborne TN, Pearce WJ. A new model of neonatal stroke: Reversible middle cerebral artery occlusion in the rat pup. *Pediatr Neurol*. 1995;12:191-196
19. Derugin N, Dingman A, Wendland MF, Fox C, Bollen A, Vexler ZS. Magnetic resonance imaging as a surrogate measure for histological sub-chronic endpoint in a neonatal rat stroke model. *Brain Res*. 2005;1066:49-56
20. Derugin N, Wendland M, Muramatsu K, Roberts TP, Gregory G, Ferriero DM, Vexler ZS. Evolution of brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in neonatal rats. *Stroke*. 2000;31:1752-1761
21. Manabat C, Han BH, Wendland M, Derugin N, Fox CK, Choi J, Holtzman DM, Ferriero DM, Vexler ZS. Reperfusion differentially induces caspase-3 activation in ischemic core and penumbra after stroke in immature brain. *Stroke*. 2003;34:207-213

22. Dingman A, Lee SY, Derugin N, Wendland MF, Vexler ZS. Aminoguanidine inhibits caspase-3 and calpain activation without affecting microglial activation following neonatal transient cerebral ischemia. *J Neurochem.* 2006;96:1467-1479
23. Chang YS, Mu D, Wendland M, Sheldon RA, Vexler ZS, McQuillen PS, Ferriero DM. Erythropoietin improves functional and histological outcome in neonatal stroke. *Pediatr Res.* 2005;58:106-111
24. Fox C, Dingman A, Derugin N, Wendland MF, Manabat C, Ji S, Ferriero DM, Vexler ZS. Minocycline confers early but transient protection in the immature brain following focal cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25:1138-1149
25. Gonzalez FF, McQuillen P, Mu D, Chang Y, Wendland M, Vexler Z, Ferriero DM. Erythropoietin enhances long-term neuroprotection and neurogenesis in neonatal stroke. *Dev Neurosci.* 2007;29:321-330
26. Rice JE, 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol.* 1981;9:131-141
27. Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol.* 1960;36:1-17
28. Vannucci RC, Lyons DT, Vasta F. Regional cerebral blood flow during hypoxia-ischemia in immature rats. *Stroke.* 1988;19:245-250
29. Vannucci RC, Brucklacher RM, Vannucci SJ. Glycolysis and perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Dev Neurosci.* 2005;27:185-190
30. Ashwal S, Tone B, Tian HR, Chong S, Obenaus A. Comparison of two neonatal ischemic injury models using magnetic resonance imaging. *Pediatr Res.* 2007;61:9-14
31. Villapol S, Bonnin P, Fau S, Baud O, Renolleau S, Charriaut-Marlangue C. Unilateral blood flow decrease induces bilateral and symmetric responses in the immature brain. *Am J Pathol.* 2009;175:2111-2120
32. Hobbs CE, Oorschot DE. Neonatal rat hypoxia-ischemia: Long-term rescue of striatal neurons and motor skills by combined antioxidant-hypothermia treatment. *Brain Pathol.* 2008;18:443-454

33. Renolleau S, Aggoun-Zouaoui D, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue C. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the p7 neonatal rat: Morphological changes indicative of apoptosis. *Stroke*. 1998;29:1454-1460; discussion 1461
34. Joly LM, Mucignat V, Mariani J, Plotkine M, Charriaut-Marlangue C. Caspase inhibition after neonatal ischemia in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004;24:124-131
35. Bonnin P, Leger PL, Deroide N, Fau S, Baud O, Pocard M, Charriaut-Marlangue C, Renolleau S. Impact of intracranial blood-flow redistribution on stroke size during ischemia-reperfusion in 7-day-old rats. *J Neurosci Methods*. 2011;198:103-109
36. Benjelloun N, Joly LM, Palmier B, Plotkine M, Charriaut-Marlangue C. Apoptotic mitochondrial pathway in neurones and astrocytes after neonatal hypoxia-ischaemia in the rat brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2003;29:350-360
37. Renolleau S, Benjelloun N, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue C. Regulation of apoptosis-associated proteins in cell death following transient focal ischemia in rat pups. *Apoptosis*. 1997;2:368-376
38. Charriaut-Marlangue C. [apoptosis and cerebral ischemia]. *Ann Pharm Fr*. 1999;57:309-313
39. Charriaut-Marlangue C. Apoptosis in immature brain: A therapeutic approach to neuronal death. *Drug Discov Today*. 2000;5:303-304
40. Charriaut-Marlangue C. Apoptosis: A target for neuroprotection. *Therapie*. 2004;59:185-190
41. Charriaut-Marlangue C, Remolleau S, Aggoun-Zouaoui D, Ben-Ari Y. Apoptosis and programmed cell death: A role in cerebral ischemia. *Biomed Pharmacother*. 1998;52:264-269
42. Ducrocq S, Benjelloun N, Plotkine M, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue C. Poly(adp-ribose) synthase inhibition reduces ischemic injury and inflammation in neonatal rat brain. *J Neurochem*. 2000;74:2504-2511



43. Biran V, Cochois V, Karroubi A, Arrang JM, Charriaut-Marlangue C, Heron A. Stroke induces histamine accumulation and mast cell degranulation in the neonatal rat brain. *Brain Pathol.* 2008;18:1-9
44. Biran V, Joly LM, Heron A, Vernet A, Vega C, Mariani J, Renolleau S, Charriaut-Marlangue C. Glial activation in white matter following ischemia in the neonatal p7 rat brain. *Exp Neurol.* 2006;199:103-112
45. Benjelloun N, Renolleau S, Represa A, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue C. Inflammatory responses in the cerebral cortex after ischemia in the p7 neonatal rat. *Stroke.* 1999;30:1916-1923; discussion 1923-1914
46. Renolleau S, Fau S, Goyenvallé C, Charriaut-Marlangue C. 'sex, neuroprotection, and neonatal ischemia'. *Dev Med Child Neurol.* 2007;49:477; author reply 477-478
47. Krishnaswamy A, Klein JP, Kapadia SR. Clinical cerebrovascular anatomy. *Catheter Cardiovasc Interv.* 75:530-539
48. Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5:347-360
49. Schaller B. Physiology of cerebral venous blood flow: From experimental data in animals to normal function in humans. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004;46:243-260
50. Meder JF, Chiras J, Roland J, Guinet P, Bracard S, Bargy F. Venous territories of the brain. *J Neuroradiol.* 1994;21:118-133
51. Liebeskind DS. Collateral circulation. *Stroke.* 2003;34:2279-2284
52. Shuaib A, Butcher K, Mohammad AA, Saqqur M, Liebeskind DS. Collateral blood vessels in acute ischaemic stroke: A potential therapeutic target. *Lancet Neurol.* 2011;10:909-921
53. Brozici M, van der Zwan A, Hillen B. Anatomy and functionality of leptomeningeal anastomoses: A review. *Stroke.* 2003;34:2750-2762
54. Defazio RA, Levy S, Morales CL, Levy RV, Dave KR, Lin HW, Abaffy T, Watson BD, Perez-Pinzon MA, Ohanna V. A protocol for characterizing the impact of collateral flow after distal middle cerebral artery occlusion. *Transl Stroke Res.* 2:112-127

55. Alpers BJ. Compensatory mechanisms in occlusive vascular disease of the brain. *Arch Neurol.* 1959;1:531-534
56. Krabbe-Hartkamp MJ, van der Grond J, de Leeuw FE, de Groot JC, Algra A, Hillen B, Breteler MM, Mali WP. Circle of willis: Morphologic variation on three-dimensional time-of-flight mr angiograms. *Radiology.* 1998;207:103-111
57. Symon L, Ishikawa S, Meyer JS. Cerebral arterial pressure changes and development of leptomeningeal collateral circulation. *Neurology.* 1963;13:237-250
58. Zhang H, Prabhakar P, Sealock R, Faber JE. Wide genetic variation in the native pial collateral circulation is a major determinant of variation in severity of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30:923-934
59. Coyle P. Diameter and length changes in cerebral collaterals after middle cerebral artery occlusion in the young rat. *Anat Rec.* 1984;210:357-364
60. Herz RC, Jonker M, Verheul HB, Hillen B, Versteeg DH, de Wildt DJ. Middle cerebral artery occlusion in wistar and fischer-344 rats: Functional and morphological assessment of the model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16:296-302
61. Chalothorn D, Clayton JA, Zhang H, Pomp D, Faber JE. Collateral density, remodeling, and vegf-a expression differ widely between mouse strains. *Physiol Genomics.* 2007;30:179-191
62. Bang OY, Saver JL, Alger JR, Shah SH, Buck BH, Starkman S, Ovbiagele B, Liebeskind DS. Patterns and predictors of blood-brain barrier permeability derangements in acute ischemic stroke. *Stroke.* 2009;40:454-461
63. Bang OY. Multimodal mri for ischemic stroke: From acute therapy to preventive strategies. *J Clin Neurol.* 2009;5:107-119
64. Silvestrini M, Altamura C, Cerqua R, Pedone C, Balucani C, Luzzi S, Bartolini M, Provinciali L, Vernieri F. Early activation of intracranial collateral vessels influences the outcome of spontaneous internal carotid artery dissection. *Stroke.* 2011;42:139-143
65. Pries AR, Secomb TW, Gessner T, Sperandio MB, Gross JF, Gaehtgens P. Resistance to blood flow in microvessels in vivo. *Circ Res.* 1994;75:904-915

66. Kocharyan A, Fernandes P, Tong XK, Vaucher E, Hamel E. Specific subtypes of cortical gaba interneurons contribute to the neurovascular coupling response to basal forebrain stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28:221-231
67. Cohen Z, Molinatti G, Hamel E. Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17:894-904
68. Itoh Y, Suzuki N. Control of brain capillary blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32:1167-1176
69. Saunders NR, Ek CJ, Habgood MD, Dziegielewska KM. Barriers in the brain: A renaissance? *Trends Neurosci.* 2008;31:279-286
70. Mosso A. Sulla circolazione del cervello dell'uomo. *Atti R Accad Lincei.* 1880;5:237-358
71. Roy C. On the regulation of the blood supply of the brain. 1890;11:85-158
72. Lassen NA, Ingvar DH. The blood flow of the cerebral cortex determined by radioactive krypton. *Experientia.* 1961;17:42-43
73. Lassen NA. Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiol Rev.* 1959;39:183-238
74. Hyder F. Dynamic imaging of brain function. *Methods Mol Biol.* 2009;489:3-21
75. Villringer A, Dirnagl U. Coupling of brain activity and cerebral blood flow: Basis of functional neuroimaging. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1995;7:240-276
76. del Zoppo GJ. The neurovascular unit in the setting of stroke. *J Intern Med.* 2007;262:156-171
77. Girouard H, Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and alzheimer disease. *J Appl Physiol.* 2006;100:328-335
78. Faraci FM, Breese KR. Nitric oxide mediates vasodilatation in response to activation of n-methyl-d-aspartate receptors in brain. *Circ Res.* 1993;72:476-480
79. Niwa K, Haensel C, Ross ME, Iadecola C. Cyclooxygenase-1 participates in selected vasodilator responses of the cerebral circulation. *Circ Res.* 2001;88:600-608

80. Niwa K, Araki E, Morham SG, Ross ME, Iadecola C. Cyclooxygenase-2 contributes to functional hyperemia in whisker-barrel cortex. *J Neurosci.* 2000;20:763-770
81. Lindauer U, Megow D, Matsuda H, Dirnagl U. Nitric oxide: A modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. *Am J Physiol.* 1999;277:H799-811
82. Lecrux C, Hamel E. The neurovascular unit in brain function and disease. *Acta Physiol (Oxf).* 2003;47-59
83. Harder DR, Alkayed NJ, Lange AR, Gebremedhin D, Roman RJ. Functional hyperemia in the brain: Hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites. *Stroke.* 1998;29:229-234
84. Simard M, Arcuino G, Takano T, Liu QS, Nedergaard M. Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci.* 2003;23:9254-9262
85. Pilitsis JG, Kimelberg HK. Adenosine receptor mediated stimulation of intracellular calcium in acutely isolated astrocytes. *Brain Res.* 1998;798:294-303
86. Koehler RC, Roman RJ, Harder DR. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci.* 2009;32:160-169
87. Koehler RC, Gebremedhin D, Harder DR. Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J Appl Physiol.* 2006;100:307-317
88. Price DL, Ludwig JW, Mi H, Schwarz TL, Ellisman MH. Distribution of rslo  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels in rat astrocyte perivascular endfeet. *Brain Res.* 2002;956:183-193
89. Roy ML, Saal D, Perney T, Sontheimer H, Waxman SG, Kaczmarek LK. Manipulation of the delayed rectifier  $Kv1.5$  potassium channel in glial cells by antisense oligodeoxynucleotides. *Glia.* 1996;18:177-184
90. Newman EA. High potassium conductance in astrocyte endfeet. *Science.* 1986;233:453-454
91. Filosa JA, Bonev AD, Straub SV, Meredith AL, Wilkerson MK, Aldrich RW, Nelson MT. Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nat Neurosci.* 2006;9:1397-1403

92. Faraci FM, Heistad DD. Regulation of the cerebral circulation: Role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev.* 1998;78:53-97
93. Nguyen TS, Winn HR, Janigro D. Atp-sensitive potassium channels may participate in the coupling of neuronal activity and cerebrovascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H878-885
94. Hamel E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol.* 2006;100:1059-1064
95. Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci.* 12:723-738
96. Peterson EC, Wang Z, Britz G. Regulation of cerebral blood flow. *Int J Vasc Med.* 2011;2011:823525
97. Faraci FM, Brian JE, Jr. Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke.* 1994;25:692-703
98. Fisher M. Advances in stroke 2008. Introduction. *Stroke.* 2009
99. Dore-Duffy P, Cleary K. Morphology and properties of pericytes. *Methods Mol Biol.* 686:49-68
100. Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of cns capillary diameter by pericytes. *Nature.* 2006;443:700-704
101. Allt G, Lawrenson JG. Pericytes: Cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs.* 2001;169:1-11
102. Krueger M, Bechmann I. Cns pericytes: Concepts, misconceptions, and a way out. *Glia.* 2009;58:1-10
103. Tuor UI. Acute hypertension and sympathetic stimulation: Local heterogeneous changes in cerebral blood flow. *Am J Physiol.* 1992;263:H511-518
104. Faraci FM, Heistad DD. Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circ Res.* 1990;66:8-17

105. Suzuki N, Hardebo JE. The cerebrovascular parasympathetic innervation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1993;5:33-46
106. Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med.* 2002;8:136-142
107. Cauli B, Tong XK, Rancillac A, Serluca N, Lambolez B, Rossier J, Hamel E. Cortical gaba interneurons in neurovascular coupling: Relays for subcortical vasoactive pathways. *J Neurosci.* 2004;24:8940-8949
108. Hamel E. Cholinergic modulation of the cortical microvascular bed. *Prog Brain Res.* 2004;145:171-178
109. Vaucher E, Tong XK, Cholet N, Lantin S, Hamel E. Gaba neurons provide a rich input to microvessels but not nitric oxide neurons in the rat cerebral cortex: A means for direct regulation of local cerebral blood flow. *J Comp Neurol.* 2000;421:161-171
110. Berridge MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol.* 2008;586:5047-5061
111. Dupui P. Régulation de la circulation cérébrale. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale (EMC).* 2006;17-003-C-10
112. Dunn KM, Nelson MT. Potassium channels and neurovascular coupling. *Circ J.* 2010;74:608-616
113. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 1995;268:C799-822
114. Rosenblum WI, Weinbrecht P, Nelson GH. Propagated constriction in mouse pial arterioles: Possible role of endothelium in transmitting the propagated response. *Microcirc Endothelium Lymphatics.* 1990;6:369-387
115. Andresen J, Shafi NI, Bryan RM, Jr. Endothelial influences on cerebrovascular tone. *J Appl Physiol.* 2006;100:318-327
116. Dietrich HH, Kajita Y, Dacey RG, Jr. Local and conducted vasomotor responses in isolated rat cerebral arterioles. *Am J Physiol.* 1996;271:H1109-1116

117. Collins DF, Cameron T, Gillard DM, Prochazka A. Muscular sense is attenuated when humans move. *J Physiol.* 1998;508 ( Pt 2):635-643
118. Segal SS, Duling BR. Communication between feed arteries and microvessels in hamster striated muscle: Segmental vascular responses are functionally coordinated. *Circ Res.* 1986;59:283-290
119. Segal SS, Duling BR. Flow control among microvessels coordinated by intercellular conduction. *Science.* 1986;234:868-870
120. Fujii K, Heistad DD, Faraci FM. Flow-mediated dilatation of the basilar artery in vivo. *Circ Res.* 1991;69:697-705
121. Puro DG. Physiology and pathobiology of the pericyte-containing retinal microvasculature: New developments. *Microcirculation.* 2007;14:1-10
122. Lu D, Barber AH. Optimized nanoscale composite behaviour in limpet teeth. *J R Soc Interface.* 9:1318-1324
123. Lansman JB. Endothelial mechanosensors. Going with the flow. *Nature.* 1988;331:481-482
124. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:9265-9269
125. Ngai AC, Winn HR. Estimation of shear and flow rates in pial arterioles during somatosensory stimulation. *Am J Physiol.* 1996;270:H1712-1717
126. Bryan RM, Jr., Steenberg ML, Marrelli SP. Role of endothelium in shear stress-induced constrictions in rat middle cerebral artery. *Stroke.* 2001;32:1394-1400
127. Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1990;2:161-192
128. Ainslie PN, Duffin J. Integration of cerebrovascular co2 reactivity and chemoreflex control of breathing: Mechanisms of regulation, measurement, and interpretation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296:R1473-1495

129. Osol G, Brekke JF, McElroy-Yaggy K, Gokina NI. Myogenic tone, reactivity, and forced dilatation: A three-phase model of in vitro arterial myogenic behavior. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H2260-2267
130. Mellander S. Functional aspects of myogenic vascular control. *J Hypertens Suppl.* 1989;7:S21-30; discussion S31
131. Kontos HA, Wei EP, Raper AJ, Rosenblum WI, Navari RM, Patterson JL, Jr. Role of tissue hypoxia in local regulation of cerebral microcirculation. *Am J Physiol.* 1978;234:H582-591
132. Kontos HA, Wei EP, Navari RM, Levasseur JE, Rosenblum WI, Patterson JL, Jr. Responses of cerebral arteries and arterioles to acute hypotension and hypertension. *Am J Physiol.* 1978;234:H371-383
133. Busija DW, Heistad DD. Factors involved in the physiological regulation of the cerebral circulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1984;101:161-211
134. Panerai RB. Cerebral autoregulation: From models to clinical applications. *Cardiovasc Eng.* 2008;8:42-59
135. Dahl KN, Kalinowski A, Pekkan K. Mechanobiology and the microcirculation: Cellular, nuclear and fluid mechanics. *Microcirculation.* 2010;17:179-191
136. Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda).* 2006;21:69-78
137. Schubert R, Lidington D, Bolz SS. The emerging role of  $Ca^{2+}$  sensitivity regulation in promoting myogenic vasoconstriction. *Cardiovasc Res.* 2008;77:8-18
138. van Beek AH, Claassen JA, Rikkert MG, Jansen RW. Cerebral autoregulation: An overview of current concepts and methodology with special focus on the elderly. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28:1071-1085
139. Czosnyka M, Brady K, Reinhard M, Smielewski P, Steiner LA. Monitoring of cerebrovascular autoregulation: Facts, myths, and missing links. *Neurocrit Care.* 2009;10:373-386



140. Harper AM, Glass HI. Effect of alterations in the arterial carbon dioxide tension on the blood flow through the cerebral cortex at normal and low arterial blood pressures. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1965;28:449-452
141. Madden JA. The effect of carbon dioxide on cerebral arteries. *Pharmacol Ther*. 1993;59:229-250
142. Kety SS, Schmidt CF. The effects of altered arterial tensions of carbon dioxide and oxygen on cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption of normal young men. *J Clin Invest*. 1948;27:484-492
143. Kety SS, Schmidt CF. The nitrous oxide method for the quantitative determination of cerebral blood flow in man; theory, procedure and normal values. *J Clin Invest*. 1948;27:476-483
144. Chesler M. Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol Rev*. 2003;83:1183-1221
145. Wei EP, Kontos HA, Patterson JL, Jr. Dependence of pial arteriolar response to hypercapnia on vessel size. *Am J Physiol*. 1980;238:697-703
146. Reich T, Rusinek H. Cerebral cortical and white matter reactivity to carbon dioxide. *Stroke*. 1989;20:453-457
147. Kitazono T, Faraci FM, Taguchi H, Heistad DD. Role of potassium channels in cerebral blood vessels. *Stroke*. 1995;26:1713-1723
148. Iadecola C, Zhang F. Permissive and obligatory roles of NO in cerebrovascular responses to hypercapnia and acetylcholine. *Am J Physiol*. 1996;271:R990-1001
149. Smith JJ, Lee JG, Hudetz AG, Hillard CJ, Bosnjak ZJ, Kampine JP. The role of nitric oxide in the cerebrovascular response to hypercapnia. *Anesth Analg*. 1997;84:363-369
150. Lavi S, Egbarya R, Lavi R, Jacob G. Role of nitric oxide in the regulation of cerebral blood flow in humans: Chemoregulation versus mechanoregulation. *Circulation*. 2003;107:1901-1905
151. Najarian T, Marrache AM, Dumont I, Hardy P, Beauchamp MH, Hou X, Peri K, Gobeil F, Jr., Varma DR, Chemtob S. Prolonged hypercapnia-evoked cerebral hyperemia via K<sup>+</sup>

channel- and prostaglandin e(2)-dependent endothelial nitric oxide synthase induction. *Circ Res.* 2000;87:1149-1156

152. Shima T, Hossmann KA, Date H. Pial arterial pressure in cats following middle cerebral artery occlusion. 1. Relationship to blood flow, regulation of blood flow and electrophysiological function. *Stroke.* 1983;14:713-719
153. Jones SC, Bose B, Furlan AJ, Friel HT, Easley KA, Meredith MP, Little JR. Co<sub>2</sub> reactivity and heterogeneity of cerebral blood flow in ischemic, border zone, and normal cortex. *Am J Physiol.* 1989;257:H473-482
154. Dirnagl U, Pulsinelli W. Autoregulation of cerebral blood flow in experimental focal brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1990;10:327-336
155. Dettmers C, Young A, Rommel T, Hartmann A, Weingart O, Baron JC. Co<sub>2</sub> reactivity in the ischaemic core, penumbra, and normal tissue 6 hours after acute mca-occlusion in primates. *Acta Neurochir (Wien).* 1993;125:150-155
156. Schmidt-Kastner R, Ophoff BG, Hossmann KA. Delayed recovery of co<sub>2</sub> reactivity after one hour's complete ischaemia of cat brain. *J Neurol.* 1986;233:367-369
157. Schmitz B, Bottiger BW, Hossmann KA. Functional activation of cerebral blood flow after cardiac arrest in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17:1202-1209
158. Nemoto EM, Snyder JV, Carroll RG, Morita H. Global ischemia in dogs: Cerebrovascular co<sub>2</sub> reactivity and autoregulation. *Stroke.* 1975;6:425-431
159. Christopherson TJ, Milde JH, Michenfelder JD. Cerebral vascular autoregulation and co<sub>2</sub> reactivity following onset of the delayed postischemic hypoperfusion state in dogs. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993;13:260-268
160. Seki H, Yoshimoto T, Ogawa A, Suzuki J. The co<sub>2</sub> response in focal cerebral ischemia--sequential changes following recirculation. *Stroke.* 1984;15:699-704
161. Ono Y, Morikawa S, Inubushi T, Shimizu H, Yoshimoto T. T<sub>2</sub>\*-weighted magnetic resonance imaging of cerebrovascular reactivity in rat reversible focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1997;744:207-215

162. Olah L, Franke C, Schwindt W, Hoehn M. Co(2) reactivity measured by perfusion mri during transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2000;31:2236-2244
163. Harris NG, Lythgoe MF, Thomas DL, Williams SR. Cerebrovascular reactivity following focal brain ischemia in the rat: A functional magnetic resonance imaging study. *Neuroimage*. 2001;13:339-350
164. Zhao P, Alsop DC, Abduljalil A, Selim M, Lipsitz L, Novak P, Caplan L, Hu K, Novak V. Vasoreactivity and peri-infarct hyperintensities in stroke. *Neurology*. 2009;72:643-649
165. Pryds A, Tonnesen J, Pryds O, Knudsen GM, Greisen G. Cerebral pressure autoregulation and vasoreactivity in the newborn rat. *Pediatr Res*. 2005;57:294-298
166. Haaland K, Karlsson B, Skovlund E, Lagercrantz H, Thoresen M. Postnatal development of the cerebral blood flow velocity response to changes in co2 and mean arterial blood pressure in the piglet. *Acta Paediatr*. 1995;84:1414-1420
167. Leffler CW, Beasley DG, Busija DW. Cerebral ischemia alters cerebral microvascular reactivity in newborn pigs. *Am J Physiol*. 1989;257:H266-271
168. Thompson BG, Pluta RM, Girton ME, Oldfield EH. Nitric oxide mediation of chemoregulation but not autoregulation of cerebral blood flow in primates. *J Neurosurg*. 1996;84:71-78
169. Philip S, Udomphorn Y, Kirkham FJ, Vavilala MS. Cerebrovascular pathophysiology in pediatric traumatic brain injury. *J Trauma*. 2009;67:S128-134
170. Rowney DA, Fairgrieve R, Bissonnette B. Cerebrovascular carbon dioxide reactivity in children anaesthetized with sevoflurane. *Br J Anaesth*. 2002;88:357-361
171. Karsli C, Luginbuehl I, Farrar M, Bissonnette B. Cerebrovascular carbon dioxide reactivity in children anaesthetized with propofol. *Paediatr Anaesth*. 2003;13:26-31
172. Wyatt JS, Edwards AD, Cope M, Delpy DT, McCormick DC, Potter A, Reynolds EO. Response of cerebral blood volume to changes in arterial carbon dioxide tension in preterm and term infants. *Pediatr Res*. 1991;29:553-557

173. Toft PB, Leth H, Lou HC, Pryds O, Peitersen B, Henriksen O. Local vascular co2 reactivity in the infant brain assessed by functional mri. *Pediatr Radiol.* 1995;25:420-424
174. Fau S, Po C, Gillet B, Sizonenko S, Mariani J, Meric P, Charriaut-Marlangue C. Effect of the reperfusion after cerebral ischemia in neonatal rats using mri monitoring. *Exp Neurol.* 2007;208:297-304
175. Fau S, Po C, Goyenvallée C, Meric P, Charriaut-Marlangue C. Do early mri signals predict lesion size in a neonatal stroke rat model? *AJNR Am J Neuroradiol.* 2012
176. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke.* 1981;12:723-725
177. Heiss WD, Rosner G. Functional recovery of cortical neurons as related to degree and duration of ischemia. *Ann Neurol.* 1983;14:294-301
178. Liebeskind DS. Collateral perfusion: Time for novel paradigms in cerebral ischemia. *Int J Stroke.* 2012;7:309-310
179. Liebeskind DS. Stroke: The currency of collateral circulation in acute ischemic stroke. *Nat Rev Neurol.* 2009;5:645-646
180. Marchal G, Furlan M, Beaudouin V, Rioux P, Hauttemment JL, Serrati C, de la Sayette V, Le Doze F, Viader F, Derlon JM, Baron JC. Early spontaneous hyperperfusion after stroke. A marker of favourable tissue outcome? *Brain.* 1996;119 ( Pt 2):409-419
181. Gourley JK, Heistad DD. Characteristics of reactive hyperemia in the cerebral circulation. *Am J Physiol.* 1984;246:H52-58
182. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 1989;20:1037-1043
183. Shigeno T, Teasdale GM, McCulloch J, Graham DI. Recirculation model following mca occlusion in rats. Cerebral blood flow, cerebrovascular permeability, and brain edema. *J Neurosurg.* 1985;63:272-277
184. Gao X, Ren C, Zhao H. Protective effects of ischemic postconditioning compared with gradual reperfusion or preconditioning. *J Neurosci Res.* 2008;86:2505-2511

185. Wang JY, Shen J, Gao Q, Ye ZG, Yang SY, Liang HW, Bruce IC, Luo BY, Xia Q. Ischemic postconditioning protects against global cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats. *Stroke*. 2008;39:983-990
186. Pulsinelli WA, Levy DE, Duffy TE. Cerebral blood flow in the four-vessel occlusion rat model. *Stroke*. 1983;14:832-834
187. Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD. A model of focal ischemic stroke in the rat: Reproducible extensive cortical infarction. *Stroke*. 1986;17:738-743
188. Nakai A, Asakura H, Taniuchi Y, Koshino T, Araki T, Siesjo BK. Effect of alpha-phenyl-n-tert-butyl nitron (pbn) on fetal cerebral energy metabolism during intrauterine ischemia and reperfusion in rats. *Pediatr Res*. 2000;47:451-456
189. Chao CR, Hohimer AR, Bissonnette JM. Fetal cerebral blood flow and metabolism during oligemia and early postoligemic reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1991;11:416-423
190. Ohtake M, Morino S, Kaidoh T, Inoue T. Three-dimensional structural changes in cerebral microvessels after transient focal cerebral ischemia in rats: Scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Neuropathology*. 2004;24:219-227
191. Clavier N, Kirsch JR, Hurn PD, Traystman RJ. Effect of postischemic hypoperfusion on vasodilatory mechanisms in cats. *Am J Physiol*. 1994;267:H2012-2018
192. Clavier N, Kirsch JR, Hurn PD, Traystman RJ. Cerebral blood flow is reduced by n omega-nitro-l-arginine methyl ester during delayed hypoperfusion in cats. *Am J Physiol*. 1994;267:H174-181
193. del Zoppo GJ, Mabuchi T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:879-894
194. MacGregor DG, Carswell HV, Graham DI, McCulloch J, Macrae IM. Impaired cerebral autoregulation 24 h after induction of transient unilateral focal ischaemia in the rat. *Eur J Neurosci*. 2000;12:58-66
195. Kunz A, Iadecola C. Cerebral vascular dysregulation in the ischemic brain. *Handb Clin Neurol*. 2009;92:283-305

196. Shiokawa O, Sadoshima S, Kusuda K, Nishimura Y, Ibayashi S, Fujishima M. Cerebral and cerebellar blood flow autoregulations in acutely induced cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats--transtentorial remote effect. *Stroke*. 1986;17:1309-1313
197. Aries MJ, Elting JW, De Keyser J, Kremer BP, Vroomen PC. Cerebral autoregulation in stroke: A review of transcranial doppler studies. *Stroke*. 2010;41:2697-2704
198. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:41-53
199. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*. 1993;123:1777-1788
200. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol*. 1999;147:891-903
201. Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol*. 2002;38:323-337
202. Wang CX, Shuaib A. Critical role of microvasculature basal lamina in ischemic brain injury. *Prog Neurobiol*. 2007;83:140-148
203. Schnittler HJ, Franke RP, Akbay U, Mrowietz C, Drenckhahn D. Improved in vitro rheological system for studying the effect of fluid shear stress on cultured cells. *Am J Physiol*. 1993;265:C289-298
204. Begley DJ, Brightman MW. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res*. 2003;61:39-78
205. del Zoppo GJ. Virchow's triad: The vascular basis of cerebral injury. *Rev Neurol Dis*. 2008;5 Suppl 1:S12-21
206. Tagaya M, Liu KF, Copeland B, Seiffert D, Engler R, Garcia JH, del Zoppo GJ. DNA scission after focal brain ischemia. Temporal differences in two species. *Stroke*. 1997;28:1245-1254
207. del Zoppo GJ, Milner R. Integrin-matrix interactions in the cerebral microvasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1966-1975

208. Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung MM, Thomas WS, del Zoppo GJ. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke*. 1994;25:202-211
209. Haring HP, Berg EL, Tsurushita N, Tagaya M, del Zoppo GJ. E-selectin appears in nonischemic tissue during experimental focal cerebral ischemia. *Stroke*. 1996;27:1386-1391; discussion 1391-1382
210. Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, Grisham MB. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*. 1989;257:G683-688
211. del Zoppo GJ. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2009;158:972-982
212. Hamann GF, Burggraf D, Martens HK, Liebetrau M, Jager G, Wunderlich N, DeGeorgia M, Krieger DW. Mild to moderate hypothermia prevents microvascular basal lamina antigen loss in experimental focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2004;35:764-769
213. Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:624-633
214. Milner R, Hung S, Wang X, Berg GI, Spatz M, del Zoppo GJ. Responses of endothelial cell and astrocyte matrix-integrin receptors to ischemia mimic those observed in the neurovascular unit. *Stroke*. 2008;39:191-197
215. Wagner S, Tagaya M, Koziol JA, Quaranta V, del Zoppo GJ. Rapid disruption of an astrocyte interaction with the extracellular matrix mediated by integrin alpha 6 beta 4 during focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke*. 1997;28:858-865
216. Tagaya M, Haring HP, Stuiver I, Wagner S, Abumiya T, Lucero J, Lee P, Copeland BR, Seiffert D, del Zoppo GJ. Rapid loss of microvascular integrin expression during focal brain ischemia reflects neuron injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21:835-846
217. Gelot A, Villapol S, Billette de Villemeur T, Renolleau S, Charriaut-Marlangue C. Astrocytic demise in the developing rat and human brain after hypoxic-ischemic damage. *Dev Neurosci*. 2009;31:459-470

218. Yang GY, Betz AL. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1994;25:1658-1664; discussion 1664-1655
219. Thomas WS, Mori E, Copeland BR, Yu JQ, Morrissey JH, del Zoppo GJ. Tissue factor contributes to microvascular defects after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 1993;24:847-853; discussion 847
220. Mori E, del Zoppo GJ, Chambers JD, Copeland BR, Arfors KE. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. *Stroke*. 1992;23:712-718
221. Minematsu K, Yamaguchi T, Omae T. 'spectacular shrinking deficit': Rapid recovery from a major hemispheric syndrome by migration of an embolus. *Neurology*. 1992;42:157-162
222. Ringelstein EB, Biniek R, Weiller C, Ammeling B, Nolte PN, Thron A. Type and extent of hemispheric brain infarctions and clinical outcome in early and delayed middle cerebral artery recanalization. *Neurology*. 1992;42:289-298
223. Schaller B, Graf R. Cerebral ischemia and reperfusion: The pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004;24:351-371
224. Aronowski J, Strong R, Grotta JC. Reperfusion injury: Demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:1048-1056
225. Kuroda S, Siesjo BK. Reperfusion damage following focal ischemia: Pathophysiology and therapeutic windows. *Clin Neurosci*. 1997;4:199-212
226. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1998;38:291-300
227. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357:1121-1135
228. Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke*. 2009;4:461-470



229. Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, Maier CM, Narasimhan P, Goeders CE, Chan PH. Oxidative stress in ischemic brain damage: Mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14:1505-1517
230. Inserte J, Barba I, Hernando V, Abellan A, Ruiz-Meana M, Rodriguez-Sinovas A, Garcia-Dorado D. Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage. *Cardiovasc Res.* 2008;77:782-790
231. Inserte J, Ruiz-Meana M, Rodriguez-Sinovas A, Barba I, Garcia-Dorado D. Contribution of delayed intracellular pH recovery to ischemic postconditioning protection. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14:923-939
232. Hausenloy DJ, Lecour S, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement prosurvival signaling pathways in ischemic postconditioning: Two sides of the same coin. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14:893-907
233. Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: A pore way to die. *Biochem Soc Trans.* 2006;34:232-237
234. Di Lisa F, Canton M, Carpi A, Kaludercic N, Menabo R, Menazza S, Semenzato M. Mitochondrial injury and protection in ischemic pre- and postconditioning. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14:881-891
235. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21:2-14
236. Bonnin P, Leger PL, Villapol S, Deroide N, Gressens P, Pocard M, Renolleau S, Baud O, Charriaut-Marlangue C. Dual action of NO synthases on blood flow and infarct volume consecutive to neonatal focal cerebral ischemia. *Exp Neurol.* 2012;236:50-57
237. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke.* 1996;27:1124-1129
238. Ferriero DM. Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia. *Dev Neurosci.* 2001;23:198-202
239. Murakami K, Kondo T, Kawase M, Li Y, Sato S, Chen SF, Chan PH. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent

- focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J Neurosci*. 1998;18:205-213
240. Maier CM, Hsieh L, Crandall T, Narasimhan P, Chan PH. Evaluating therapeutic targets for reperfusion-related brain hemorrhage. *Ann Neurol*. 2006;59:929-938
  241. Ridder DA, Schwaninger M. Nf-kappab signaling in cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2009;158:995-1006
  242. Irving EA, Bamford M. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22:631-647
  243. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. Pi3k: Downstream aktion blocks apoptosis. *Cell*. 1997;88:435-437
  244. Vaughan-Jones RD, Spitzer KW, Swietach P. Intracellular ph regulation in heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46:318-331
  245. Imahashi K, Kusuoka H, Hashimoto K, Yoshioka J, Yamaguchi H, Nishimura T. Intracellular sodium accumulation during ischemia as the substrate for reperfusion injury. *Circ Res*. 1999;84:1401-1406
  246. Schafer C, Ladilov Y, Inserte J, Schafer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, Piper HM. Role of the reverse mode of the na<sup>+</sup>/ca<sup>2+</sup> exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res*. 2001;51:241-250
  247. Halestrap AP. Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at ph values below 7. Implications for the protective effect of low ph against chemical and hypoxic cell damage. *Biochem J*. 1991;278 ( Pt 3):715-719
  248. Zhao X, Newcomb JK, Posmantur RM, Wang KK, Pike BR, Hayes RL. Ph dependency of mu-calpain and m-calpain activity assayed by casein zymography following traumatic brain injury in the rat. *Neurosci Lett*. 1998;247:53-57
  249. Cohen MV, Yang XM, Downey JM. The ph hypothesis of postconditioning: Staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation*. 2007;115:1895-1903

250. Fujita M, Asanuma H, Hirata A, Wakeno M, Takahama H, Sasaki H, Kim J, Takashima S, Tsukamoto O, Minamino T, Shinozaki Y, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H2004-2008
251. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*. 1999;341 ( Pt 2):233-249
252. Leung AW, Halestrap AP. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1777:946-952
253. Baines CP. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46:850-857
254. Halestrap AP, Brenner C. The adenine nucleotide translocase: A central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem*. 2003;10:1507-1525
255. McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: Association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:3170-3174
256. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC. The adp/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*. 2004;427:461-465
257. Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol*. 2007;9:550-555
258. Giorgio V, Soriano ME, Basso E, Bisetto E, Lippe G, Forte MA, Bernardi P. Cyclophilin d in mitochondrial pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*. 1797:1113-1118
259. Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H1654-1661

260. Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;38:367-374
261. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkentin JD. Loss of cyclophilin d reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 2005;434:658-662
262. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y. Cyclophilin d-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature.* 2005;434:652-658
263. Halestrap A. Biochemistry: A pore way to die. *Nature.* 2005;434:578-579
264. Wohlrab H. Molecular aspects of inorganic phosphate transport in mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1986;853:115-134
265. Alcala S, Klee M, Fernandez J, Fleischer A, Pimentel-Muinos FX. A high-throughput screening for mammalian cell death effectors identifies the mitochondrial phosphate carrier as a regulator of cytochrome c release. *Oncogene.* 2008;27:44-54
266. Kintner DB, Wang Y, Sun D. Role of membrane ion transport proteins in cerebral ischemic damage. *Front Biosci.* 2007;12:762-770
267. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2004;61:372-385
268. Pignataro G, Esposito E, Cuomo O, Sirabella R, Boscia F, Guida N, Di Renzo G, Annunziato L. The ncx3 isoform of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger contributes to neuroprotection elicited by ischemic postconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;31:362-370
269. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007;87:99-163
270. Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic  $\text{NAD}^+$  and is a

causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem*. 2001;276:2571-2575

271. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 1995;307 ( Pt 1):93-98
272. Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World J Cardiol*. 2011;3:186-200
273. Hausenloy DJ, Duchen MR, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2003;60:617-625
274. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by cyclosporin a of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1993;25:1461-1469
275. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, Andre-Fouet X, Ovize M. Postconditioning the human heart. *Circulation*. 2005;112:2143-2148
276. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, Andre-Fouet X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, Ovize M. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008;359:473-481
277. Sims NR, Muyderman H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802:80-91
278. Robertson CL, Scafidi S, McKenna MC, Fiskum G. Mitochondrial mechanisms of cell death and neuroprotection in pediatric ischemic and traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2009;218:371-380
279. Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin a of a  $Ca^{2+}$ -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J*. 1988;255:357-360

280. Duchen MR, McGuinness O, Brown LA, Crompton M. On the involvement of a cyclosporin a sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1993;27:1790-1794
281. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1366:79-94
282. Shiga Y, Onodera H, Matsuo Y, Kogure K. Cyclosporin a protects against ischemia-reperfusion injury in the brain. *Brain Res.* 1992;595:145-148
283. Yoshimoto T, Uchino H, He QP, Li PA, Siesjo BK. Cyclosporin a, but not fk506, prevents the downregulation of phosphorylated akt after transient focal ischemia in the rat. *Brain Res.* 2001;899:148-158
284. Uchino H, Elmer E, Uchino K, Lindvall O, Siesjo BK. Cyclosporin a dramatically ameliorates ca1 hippocampal damage following transient forebrain ischaemia in the rat. *Acta Physiol Scand.* 1995;155:469-471
285. Uchino H, Elmer E, Uchino K, Li PA, He QP, Smith ML, Siesjo BK. Amelioration by cyclosporin a of brain damage in transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res.* 1998;812:216-226
286. Matsumoto S, Friberg H, Ferrand-Drake M, Wieloch T. Blockade of the mitochondrial permeability transition pore diminishes infarct size in the rat after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:736-741
287. Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, Hetz C, Danial NN, Moskowitz MA, Korsmeyer SJ. Cyclophilin d is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:12005-12010
288. Hausenloy DJ, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: Taking a risk for cardioprotection. *Heart Fail Rev.* 2007;12:217-234
289. Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM. The reperfusion injury salvage kinase pathway: A common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med.* 2005;15:69-75

290. Chance B, Williams GR. A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature*. 1955;176:250-254
291. Chance B, Williams GR. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature*. 1955;175:1120-1121
292. Nakai A, Taniuchi Y, Asakura H, Oya A, Yokota A, Koshino T, Araki T. Developmental changes in mitochondrial activity and energy metabolism in fetal and neonatal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 2000;121:67-72
293. Nakai A, Shibasaki Y, Taniuchi Y, Miyake H, Oya A, Takeshita T. Role of mitochondrial permeability transition in fetal brain damage in rats. *Pediatr Neurol*. 2004;30:247-253
294. Nakai A, Taniuchi Y, Asakura H, Yokota A, Koshino T, Araki T. Secondary mitochondrial dysfunction after transient intrauterine ischemia in the fetal rat brain. *J Obstet Gynaecol Res*. 2000;26:383-387
295. Kuroda S, Katsura K, Hillered L, Bates TE, Siesjo BK. Delayed treatment with alpha-phenyl-n-tert-butyl nitron (pbn) attenuates secondary mitochondrial dysfunction after transient focal cerebral ischemia in the rat. *Neurobiol Dis*. 1996;3:149-157
296. Folbergrova J, Zhao Q, Katsura K, Siesjo BK. N-tert-butyl-alpha-phenylnitron improves recovery of brain energy state in rats following transient focal ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:5057-5061
297. Lorek A, Takei Y, Cady EB, Wyatt JS, Penrice J, Edwards AD, Peebles D, Wylezinska M, Owen-Reece H, Kirkbride V, et al. Delayed ("Secondary") cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: Continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res*. 1994;36:699-706
298. Nioka S, Smith DS, Mayevsky A, Dobson GP, Veech RL, Subramanian H, Chance B. Age dependence of steady state mitochondrial oxidative metabolism in the in vivo hypoxic dog brain. *Neurol Res*. 1991;13:25-32
299. Puka-Sundvall M, Gajkowska B, Cholewinski M, Blomgren K, Lazarewicz JW, Hagberg H. Subcellular distribution of calcium and ultrastructural changes after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats. *Brain Res Dev Brain Res*. 2000;125:31-41

300. Rousset CI, Baburamani AA, Thornton C, Hagberg H. Mitochondria and perinatal brain injury. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25 Suppl 1:35-38
301. Schonfeld P, Reiser G. Ca<sup>2+</sup> storage capacity of rat brain mitochondria declines during the postnatal development without change in ros production capacity. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9:191-199
302. Wang X, Carlsson Y, Basso E, Zhu C, Rousset CI, Rasola A, Johansson BR, Blomgren K, Mallard C, Bernardi P, Forte MA, Hagberg H. Developmental shift of cyclophilin d contribution to hypoxic-ischemic brain injury. *J Neurosci.* 2009;29:2588-2596
303. Wang X, Han W, Du X, Zhu C, Carlsson Y, Mallard C, Jacotot E, Hagberg H. Neuroprotective effect of bax-inhibiting peptide on neonatal brain injury. *Stroke.* 2010;41:2050-2055
304. Vekrellis K, McCarthy MJ, Watson A, Whitfield J, Rubin LL, Ham J. Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system. *Development.* 1997;124:1239-1249
305. Merry DE, Veis DJ, Hickey WF, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult pns. *Development.* 1994;120:301-311
306. Zhu C, Wang X, Huang Z, Qiu L, Xu F, Vahsen N, Nilsson M, Eriksson PS, Hagberg H, Culmsee C, Plesnila N, Kroemer G, Blomgren K. Apoptosis-inducing factor is a major contributor to neuronal loss induced by neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ.* 2007;14:775-784
307. Hagberg H, Mallard C, Rousset CI, Xiaoyang W. Apoptotic mechanisms in the immature brain: Involvement of mitochondria. *J Child Neurol.* 2009;24:1141-1146
308. Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. Iv. The respiratory chain. *J Biol Chem.* 1955;217:429-438
309. Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. Iii. The steady state. *J Biol Chem.* 1955;217:409-427



310. Chance B, Williams GR, Holmes WF, Higgins J. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. V. A mechanism for oxidative phosphorylation. *J Biol Chem.* 1955;217:439-451
311. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J.* 2011;435:297-312
312. Kristian T. Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. *Cell Calcium.* 2004;36:221-233
313. Mitchell P, Moyle J. Estimation of membrane potential and ph difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. *Eur J Biochem.* 1969;7:471-484
314. Rehncrona S, Mela L, Siesjo BK. Recovery of brain mitochondrial function in the rat after complete and incomplete cerebral ischemia. *Stroke.* 1979;10:437-446
315. Anderson MF, Sims NR. Mitochondrial respiratory function and cell death in focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 1999;73:1189-1199
316. Hillered L, Siesjo BK, Arfors KE. Mitochondrial response to transient forebrain ischemia and recirculation in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1984;4:438-446
317. Ginsberg MD, Mela L, Wrobel-Kuhl K, Reivich M. Mitochondrial metabolism following bilateral cerebral ischemia in the gerbil. *Ann Neurol.* 1977;1:519-527
318. Wagner KR, Kleinholz M, Myers RE. Delayed neurologic deterioration following anoxia: Brain mitochondrial and metabolic correlates. *J Neurochem.* 1989;52:1407-1417
319. Linn F, Paschen W, Ophoff BG, Hossmann KA. Mitochondrial respiration during recirculation after prolonged ischemia in cat brain. *Exp Neurol.* 1987;96:321-333
320. Almeida A, Allen KL, Bates TE, Clark JB. Effect of reperfusion following cerebral ischaemia on the activity of the mitochondrial respiratory chain in the gerbil brain. *J Neurochem.* 1995;65:1698-1703
321. Nakai A, Kuroda S, Kristian T, Siesjo BK. The immunosuppressant drug fk506 ameliorates secondary mitochondrial dysfunction following transient focal cerebral ischemia in the rat. *Neurobiol Dis.* 1997;4:288-300

322. Sims NR, Muyderman H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochim Biophys Acta*.1802:80-91
323. Wagner KR, Kleinholz M, Myers RE. Delayed decreases in specific brain mitochondrial electron transfer complex activities and cytochrome concentrations following anoxia/ischemia. *J Neurol Sci*. 1990;100:142-151
324. Wagner KR, Kleinholz M, Myers RE. Delayed onset of neurologic deterioration following anoxia/ischemia coincides with appearance of impaired brain mitochondrial respiration and decreased cytochrome oxidase activity. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1990;10:417-423
325. Canevari L, Kuroda S, Bates TE, Clark JB, Siesjo BK. Activity of mitochondrial respiratory chain enzymes after transient focal ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:1166-1169
326. Allen KL, Almeida A, Bates TE, Clark JB. Changes of respiratory chain activity in mitochondrial and synaptosomal fractions isolated from the gerbil brain after graded ischaemia. *J Neurochem*. 1995;64:2222-2229
327. Li PA, Kristian T, He QP, Siesjo BK. Cyclosporin a enhances survival, ameliorates brain damage, and prevents secondary mitochondrial dysfunction after a 30-minute period of transient cerebral ischemia. *Exp Neurol*. 2000;165:153-163
328. Sims NR, Pulsinelli WA. Altered mitochondrial respiration in selectively vulnerable brain subregions following transient forebrain ischemia in the rat. *J Neurochem*. 1987;49:1367-1374
329. Kagstrom E, Smith ML, Siesjo BK. Local cerebral blood flow in the recovery period following complete cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1983;3:170-182
330. Miller CL, Lampard DG, Alexander K, Brown WA. Local cerebral blood flow following transient cerebral ischemia. I. Onset of impaired reperfusion within the first hour following global ischemia. *Stroke*. 1980;11:534-541
331. Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: Ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26:1114-1121

332. Saganova K, Galik J, Blasko J, Korimova A, Racekova E, Vanicky I. Immunosuppressant fk506: Focusing on neuroprotective effects following brain and spinal cord injury. *Life Sci.* 91:77-82
333. Sims NR, Anderson MF, Hobbs LM, Powell JA, Zaidan E. Brain mitochondrial responses to postischemic reperfusion: A role for calcium and hydrogen peroxide? *Dev Neurosci.* 2000;22:366-375
334. Hossmann KA. Reperfusion of the brain after global ischemia: Hemodynamic disturbances. *Shock.* 1997;8:95-101; discussion 102-103
335. Rosenberg AA, Parks JK, Murdaugh E, Parker WD, Jr. Mitochondrial function after asphyxia in newborn lambs. *Stroke.* 1989;20:674-679
336. Ten VS, Yao J, Ratner V, Sosunov S, Fraser DA, Botto M, Sivasankar B, Morgan BP, Silverstein S, Stark R, Polin R, Vannucci SJ, Pinsky D, Starkov AA. Complement component c1q mediates mitochondria-driven oxidative stress in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Neurosci.* 2010;30:2077-2087
337. Puka-Sundvall M, Wallin C, Gilland E, Hallin U, Wang X, Sandberg M, Karlsson J, Blomgren K, Hagberg H. Impairment of mitochondrial respiration after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: Relationship to activation of caspase-3 and neuronal injury. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000;125:43-50
338. Gilland E, Puka-Sundvall M, Hillered L, Hagberg H. Mitochondrial function and energy metabolism after hypoxia-ischemia in the immature rat brain: Involvement of nmda-receptors. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:297-304
339. Niatetskaya ZV, Sosunov SA, Matsiukevich D, Utkina-Sosunova IV, Ratner VI, Starkov AA, Ten VS. The oxygen free radicals originating from mitochondrial complex i contribute to oxidative brain injury following hypoxia-ischemia in neonatal mice. *J Neurosci.* 2012;32:3235-3244
340. Renolleau S, Fau S, Goyenvallé C, Joly LM, Chauvier D, Jacotot E, Mariani J, Charriaut-Marlangue C. Specific caspase inhibitor q-vd-oph prevents neonatal stroke in p7 rat: A role for gender. *J Neurochem.* 2007;100:1062-1071

341. Puka-Sundvall M, Gilland E, Hagberg H. Cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: Involvement of mitochondrial permeability transition? *Dev Neurosci.* 2001;23:192-197
342. Matsumoto S, Isshiki A, Watanabe Y, Wieloch T. Restricted clinical efficacy of cyclosporin a on rat transient middle cerebral artery occlusion. *Life Sci.* 2002;72:591-600
343. Hwang JH, Lee JH, Lee KH, Bae EJ, Sung DK, Chang YS, Park WS. Cyclosporine a attenuates hypoxic-ischemic brain injury in newborn rats. *Brain Res.* 2011;1359:208-215
344. Leger PL, De Paulis D, Branco S, Bonnin P, Couture-Lepetit E, Baud O, Renolleau S, Ovize M, Gharib A, Charriaut-Marlangue C. Evaluation of cyclosporine a in a stroke model in the immature rat brain. *Exp Neurol.* 230:58-66
345. Bonnin P, Debbabi H, Mariani J, Charriaut-Marlangue C, Renolleau S. Ultrasonic assessment of cerebral blood flow changes during ischemia-reperfusion in 7-day-old rats. *Ultrasound Med Biol.* 2008;34:913-922
346. Gateau-Roesch O, Pavlov E, Lazareva AV, Limarenko EA, Levrat C, Saris NE, Louisot P, Mironova GD. Calcium-binding properties of the mitochondrial channel-forming hydrophobic component. *J Bioenerg Biomembr.* 2000;32:105-110
347. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254
348. Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, Gomez L, Loufouat J, Thivolet-Bejui F, Robert D, Ovize M. Preconditioning delays  $Ca^{2+}$ -induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res.* 2004;61:115-122
349. Jay TM, Lucignani G, Crane AM, Jehle J, Sokoloff L. Measurement of local cerebral blood flow with [ $^{14}C$ ]iodoantipyrine in the mouse. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1988;8:121-129
350. Joutel A, Monet-Lepretre M, Gosele C, Baron-Menguy C, Hammes A, Schmidt S, Lemaire-Carrette B, Domenga V, Schedl A, Lacombe P, Hubner N. Cerebrovascular dysfunction and microcirculation rarefaction precede white matter lesions in a mouse genetic model of cerebral ischemic small vessel disease. *J Clin Invest.* 2010;120:433-445
351. Goadsby P. Neurovascular control of the cerebral circulation. 2002:172-188

352. Willie CK, Colino FL, Bailey DM, Tzeng YC, Binsted G, Jones LW, Haykowsky MJ, Bellapart J, Ogoh S, Smith KJ, Smirl JD, Day TA, Lucas SJ, Eller LK, Ainslie PN. Utility of transcranial doppler ultrasound for the integrative assessment of cerebrovascular function. *J Neurosci Methods*. 1996;221-237
353. Giller CA, Bowman G, Dyer H, Mootz L, Krippner W. Cerebral arterial diameters during changes in blood pressure and carbon dioxide during craniotomy. *Neurosurgery*. 1993;32:737-741; discussion 741-732
354. Newell DW, Aaslid R, Lam A, Mayberg TS, Winn HR. Comparison of flow and velocity during dynamic autoregulation testing in humans. *Stroke*. 1994;25:793-797
355. Frerichs KU, Feuerstein GZ. Laser-doppler flowmetry. A review of its application for measuring cerebral and spinal cord blood flow. *Mol Chem Neuropathol*. 1990;12:55-70
356. Briers JD. Laser doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiol Meas*. 2001;22:R35-66
357. Dunn AK, Bolay H, Moskowitz MA, Boas DA. Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21:195-201
358. Ayata C, Dunn AK, Gursoy OY, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Laser speckle flowmetry for the study of cerebrovascular physiology in normal and ischemic mouse cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004;24:744-755
359. Fujita Y, Ihara M, Ushiki T, Hirai H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Ito H, Takahashi R. Early protective effect of bone marrow mononuclear cells against ischemic white matter damage through augmentation of cerebral blood flow. *Stroke*. 2011;41:2938-2943
360. Ohshima M, Tsuji M, Taguchi A, Kasahara Y, Ikeda T. Cerebral blood flow during reperfusion predicts later brain damage in a mouse and a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Exp Neurol*. 2012;233:481-489
361. Blomgren K, Zhu C, Hallin U, Hagberg H. Mitochondria and ischemic reperfusion damage in the adult and in the developing brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304:551-559

362. Zhao H. Ischemic postconditioning as a novel avenue to protect against brain injury after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29:873-885
363. Pignataro G, Meller R, Inoue K, Ordonez AN, Ashley MD, Xiong Z, Gala R, Simon RP. In vivo and in vitro characterization of a novel neuroprotective strategy for stroke: Ischemic postconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28:232-241
364. Charriaut-Marlangue C, Bonnin P, Gharib A, Leger PL, Villapol S, Pocard M, Gressens P, Renolleau S, Baud O. Inhaled nitric oxide reduces brain damage by collateral recruitment in a neonatal stroke model. *Stroke.* 2012
365. Liebeskind DS. Recanalization and reperfusion in acute ischemic stroke. *F1000 Med Rep.* 2
366. Pan J, Konstas AA, Bateman B, Ortolano GA, Pile-Spellman J. Reperfusion injury following cerebral ischemia: Pathophysiology, mr imaging, and potential therapies. *Neuroradiology.* 2007;49:93-102
367. Bonnin P, Leger PL, Villapol S, Deroide N, Gressens P, Pocard M, Renolleau S, Baud O, Charriaut-Marlangue C. Dual action of no synthases on blood flow and infarct volume consecutive to neonatal focal cerebral ischemia. *Exp Neurol.* 236:50-57
368. Osman MM, Lulic D, Glover L, Stahl CE, Lau T, van Loveren H, Borlongan CV. Cyclosporine-a as a neuroprotective agent against stroke: Its translation from laboratory research to clinical application. *Neuropeptides.* 2011;45:359-368
369. Yoshimoto T, Siesjo BK. Posttreatment with the immunosuppressant cyclosporin a in transient focal ischemia. *Brain Res.* 1999;839:283-291
370. Begley DJ, Squires LK, Zlokovic BV, Mitrovic DM, Hughes CC, Revest PA, Greenwood J. Permeability of the blood-brain barrier to the immunosuppressive cyclic peptide cyclosporin a. *J Neurochem.* 1990;55:1222-1230
371. Ek CJ, Dziegielewska KM, Habgood MD, Saunders NR. Barriers in the developing brain and neurotoxicology. *Neurotoxicology.* 2012;33:586-604
372. Tsai CE, Daood MJ, Lane RH, Hansen TW, Gruetzmacher EM, Watchko JF. P-glycoprotein expression in mouse brain increases with maturation. *Biol Neonate.* 2002;81:58-64

373. Gazzin S, Strazielle N, Schmitt C, Fevre-Montange M, Ostrow JD, Tiribelli C, Gherzi-Egea JF. Differential expression of the multidrug resistance-related proteins abcb1 and abcc1 between blood-brain interfaces. *J Comp Neurol*. 2008;510:497-507
374. Murozono M, Matsumoto S, Matsumoto E, Isshiki A, Watanabe Y. Neuroprotective and neurotoxic effects of cyclosporine a on transient focal ischemia in mdr1a knockout mice. *Eur J Pharmacol*. 2004;498:115-118
375. Kaminska B, Gaweda-Walerych K, Zawadzka M. Molecular mechanisms of neuroprotective action of immunosuppressants--facts and hypotheses. *J Cell Mol Med*. 2004;8:45-58
376. Sobrado M, Ramirez BG, Neria F, Lizasoain I, Arbones ML, Minami T, Redondo JM, Moro MA, Cano E. Regulator of calcineurin 1 (rcan1) has a protective role in brain ischemia/reperfusion injury. *J Neuroinflammation*. 2012;9:48
377. Morin D, Assaly R, Paradis S, Berdeaux A. Inhibition of mitochondrial membrane permeability as a putative pharmacological target for cardioprotection. *Curr Med Chem*. 2009;16:4382-4398
378. Mattson MP, Kroemer G. Mitochondria in cell death: Novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med*. 2003;9:196-205
379. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: Comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H579-588
380. Zhao ZQ. Postconditioning in reperfusion injury: A status report. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2010;24:265-279
381. Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. Postconditioning: Reduction of reperfusion-induced injury. *Cardiovasc Res*. 2006;70:200-211
382. Vinten-Johansen J, Granfeldt A, Mykytenko J, Undyala VV, Dong Y, Przyklenk K. The multidimensional physiological responses to postconditioning. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14:791-810

383. Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, Tincey S, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Of mice and dogs: Species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol.* 2004;164:665-677
384. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2004;62:74-85
385. Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, Amerson BS, Halkos ME, Kerendi F, Zhao ZQ, Guyton RA, Headrick JP, Vinten-Johansen J. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res.* 2005;67:124-133
386. Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1103-1110
387. Yang XM, Liu Y, Tandon N, Kambayashi J, Downey JM, Cohen MV. Attenuation of infarction in cynomolgus monkeys: Preconditioning and postconditioning. *Basic Res Cardiol.* 105:119-128
388. Inserte J, Barba I, Hernando V, Garcia-Dorado D. Delayed recovery of intracellular acidosis during reperfusion prevents calpain activation and determines protection in postconditioned myocardium. *Cardiovasc Res.* 2009;81:116-122
389. Leger PL, De Paulis D, Branco S, Bonnin P, Couture-Lepetit E, Baud O, Renolleau S, Ovize M, Gharib A, Charriaut-Marlangue C. Evaluation of cyclosporine a in a stroke model in the immature rat brain. *Exp Neurol.* 2011;230:58-66
390. Kim YK, Leem JG, Shin JW, Joung KW. Ischemic postconditioning may not influence early brain injury induced by focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Korean J Anesthesiol.* 2010;58:176-183
391. Xing B, Chen H, Zhang M, Zhao D, Jiang R, Liu X, Zhang S. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat. *Stroke.* 2008;39:2362-2369
392. Ren C, Gao X, Niu G, Yan Z, Chen X, Zhao H. Delayed postconditioning protects against focal ischemic brain injury in rats. *PLoS One.* 2008;3:e3851



393. Abas F, Alkan T, Goren B, Taskapilioglu O, Sarandol E, Tolunay S. Neuroprotective effects of postconditioning on lipid peroxidation and apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Turk Neurosurg.* 2010;20:1-8
394. Robin E, Simerabet M, Hassoun SM, Adamczyk S, Tavernier B, Vallet B, Bordet R, Lebuffe G. Postconditioning in focal cerebral ischemia: Role of the mitochondrial atp-dependent potassium channel. *Brain Res.* 2011;1375:137-146
395. Gao X, Zhang H, Takahashi T, Hsieh J, Liao J, Steinberg GK, Zhao H. The akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the mapk and pkc pathways. *J Neurochem.* 2008;105:943-955
396. Sun J, Luan Q, Dong H, Song W, Xie K, Hou L, Xiong L. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening contributes to the neuroprotective effects of ischemic postconditioning in rats. *Brain Res.* 2012;1436:101-110
397. Danielisova V, Nemethova M, Gottlieb M, Burda J. The changes in endogenous antioxidant enzyme activity after postconditioning. *Cell Mol Neurobiol.* 2006;26:1181-1191
398. Fabian RH, Perez-Polo JR, Kent TA. Perivascular nitric oxide and superoxide in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:H1809-1814
399. Plotkine M, Margail I. [no synthases: New pharmacological targets in cerebrovascular accident?]. *Therapie.* 2002;57:548-553
400. van den Tweel ER, Nijboer C, Kavelaars A, Heijnen CJ, Groenendaal F, van Bel F. Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitrotyrosine formation after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neuroimmunol.* 2005;167:64-71
401. Pinard E, Engrand N, Seylaz J. Dynamic cerebral microcirculatory changes in transient forebrain ischemia in rats: Involvement of type i nitric oxide synthase. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20:1648-1658
402. Gidday JM, Shah AR, Maceren RG, Wang Q, Pelligrino DA, Holtzman DM, Park TS. Nitric oxide mediates cerebral ischemic tolerance in a neonatal rat model of hypoxic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:331-340

403. Willmot M, Gibson C, Gray L, Murphy S, Bath P. Nitric oxide synthase inhibitors in experimental ischemic stroke and their effects on infarct size and cerebral blood flow: A systematic review. *Free Radic Biol Med.* 2005;39:412-425
404. Vannucci RC, Yager JY, Vannucci SJ. Cerebral glucose and energy utilization during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;14:279-288
405. Yager JY, Brucklacher RM, Vannucci RC. Cerebral energy metabolism during hypoxia-ischemia and early recovery in immature rats. *Am J Physiol.* 1992;262:H672-677
406. Armitage GA, Todd KG, Shuaib A, Winship IR. Laser speckle contrast imaging of collateral blood flow during acute ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30:1432-1436
407. Lyons DT, Vasta F, Vannucci RC. Autoradiographic determination of regional cerebral blood flow in the immature rat. *Pediatr Res.* 1987;21:471-476
408. Sakurada O, Kennedy C, Jehle J, Brown JD, Carbin GL, Sokoloff L. Measurement of local cerebral blood flow with iodo [14c] antipyrine. *Am J Physiol.* 1978;234:H59-66
409. Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A, Boyet S. Postnatal changes in local cerebral blood flow measured by the quantitative autoradiographic [14c]iodoantipyrine technique in freely moving rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1989;9:579-588
410. Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: Crucial role of s-nitrosylation of mitochondrial complex i and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:7631-7636
411. Riobo NA, Clementi E, Melani M, Boveris A, Cadenas E, Moncada S, Poderoso JJ. Nitric oxide inhibits mitochondrial nadh:Ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem J.* 2001;359:139-145
412. Sharpe MA, Cooper CE. Interaction of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase. Catalytic production of nitric oxide and irreversible inhibition of enzyme activity. *J Biol Chem.* 1998;273:30961-30972
413. Moro MA, Almeida A, Bolanos JP, Lizasoain I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radic Biol Med.* 2005;39:1291-1304

